



Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale

Clémentine Lepinay

► To cite this version:

Clémentine Lepinay. Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale. Sciences agricoles. Université de Bourgogne, 2013. Français. NNT : 2013DIJOS022 . tel-01152607

HAL Id: tel-01152607

<https://theses.hal.science/tel-01152607>

Submitted on 18 May 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole Doctorale Environnements-Santé

INRA

Unité mixte de Recherche 1347 Agroécologie INRA/AgroSup/uB
Pôle Ecologie des communautés et durabilité des systèmes agricoles

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Sciences Vie

Spécialité : Ecologie microbienne

par

Clémentine LEPINAY

Le 15 Mai 2013

Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes, au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale

Directeur de thèse - Christophe MOUGEL

Jury:

Jean-Claude CLEYET-MAREL	Directeur de Recherche, INRA, Montpellier	Rapporteur
Christophe ROBIN	Directeur de Recherche, INRA, Nancy	Rapporteur
Dirk REDECKER	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon	Examineur
Stéphane UROZ	Chargé de recherche, INRA, Nancy	Examineur
Christophe MOUGEL	Directeur de Recherche, INRA, Dijon	Directeur de thèse
Christophe SALON	Directeur de Recherche, INRA, Dijon	Co-encadrant de thèse
Thierry RIGAUD	Directeur de Recherche, CNRS, Dijon	Invité

*Je dédie cette thèse à ma Famille bien aimée,
à ma Grand-mère, éternelle source de soutien et de motivation
à mon Père, pour son admiration silencieuse qui me pousse à avancer
à ma Mère, pour ses encouragements sévères qui me forcent à persévérer*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les financeurs de ce projet, l'**Inra** et la **Région Bourgogne**, qui m'ont permis de réaliser ce travail de thèse.

Je souhaite aussi remercier **Philippe Lemanceau** pour m'avoir accueillie au sein de l'INRA de Dijon, et plus particulièrement au sein de son équipe de recherche, l'équipe 1 de l'ex UMR MSE. Je le remercie pour son attention et son esprit critique qui m'ont permis de trouver des solutions ou des idées nouvelles dans l'aspect pratique du travail de thèse. Je le remercie également pour ses corrections et sa disponibilité. Enfin, merci pour ses félicitations, à diverses occasions, qui ont été source de motivation.

Je remercie également mon directeur de thèse, **Christophe Mougel**, pour m'avoir encadrée durant les stages de Master 1 et 2 et m'avoir par la suite confié ce projet de thèse. Je le remercie de m'avoir permis de développer mon autonomie de travail et pour l'entière confiance qu'il m'a accordé concernant la valorisation de mes travaux de thèse. Je le remercie aussi pour ses nombreux avis et suggestions concernant les résultats des diverses expérimentations conduites durant la thèse, de même que pour ses corrections.

Je tiens aussi à remercier les membres de mon comité de thèse et particulièrement **Christophe Salon** et **Thierry Rigaud** qui me suivent depuis le Master 1, pour avoir été respectivement des co-directeurs et co-encadrants très réactifs et très motivants. Merci pour vos nombreuses corrections toujours constructives et vos conseils avisés sur les différentes expérimentations. Merci à Thierry pour son aide dans la partie statistiques et l'analyse des résultats. Enfin, merci pour votre bonne humeur et votre intérêt pour ce projet durant ces années de Master et de Thèse. Je remercie également **Brigitte Brunel** pour son investissement en tant que membre extérieur du comité de thèse. Je la remercie pour ses avis et suggestions sur mon travail mais aussi pour avoir toujours été disponible malgré la distance.

Merci également aux membres du jury qui ont accepté cette tâche laborieuse qu'est la lecture d'une thèse, notamment les examinateurs, **Stéphane Uroz** et **Dirk Redecker**, et un grand merci aux rapporteurs qui ont dû, en plus, juger ce travail, **Jean Claude Cleyet-Marel** et **Christophe Robin**. J'espère avoir réussi à rendre ce manuscrit raisonnablement ennuyeux.

Merci à tous les membres de l'équipe 1 de l'ex UMR MSE avec lesquels j'ai passé la majorité de ma thèse et en particulier **Thérèse Corberand** pour son aide à la paillasse, ses précieux conseils, et pour m'avoir formée à certaines techniques de laboratoire. Merci aussi à **Amandine Viollet** pour ses conseils, sa disponibilité et toute son ingéniosité dans la résolution des problèmes à la paillasse.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude envers les personnes qui m'ont aidée lors des diverses expérimentations : **Céline Faivre-Primot**, pour son aide précieuse, sa gentillesse et sa bonne humeur, **Jérôme Manificier**, pour son aide à cette activité plaisante qu'est l'ouverture manuelle des gousses de *Medicago*, **Tiffanie Regnier** pour m'avoir formée efficacement à la biologie moléculaire, **Christian Jeudy** pour s'être occupé de l'aspect CO₂ et solution

nutritive des essais en serres, **Florence Deau** pour les dernières analyses de biologie moléculaire et son aide à la paillasse et **Florence Strbik** pour les prises de photos en serres.

Je remercie aussi mes stagiaires, **Daisy Erasso** et **Ismahane Kamoune**, qui ont effectué leur stage de Master 1 avec moi et qui ont été très attentives, intéressées et efficaces. Je les remercie également pour leur sympathie.

J'adresse aussi mes remerciements à **Laure Avoscan**, **Eric Bernaud**, **Barbara Pivato**, **Frank Zenk**, **Delphine Moreau**, **Anne-Lise Santoni**, **Sébastien Terrat** et **Anouk Zancarini** pour avoir sacrifié un peu de leur temps à mes expérimentations ou pour leurs conseils avisés.

Merci à tous les autres, que je ne cite pas, personnel de la laverie, de la réserve, secrétaires, collègues de l'UMR ou extérieur, à qui j'ai demandé des renseignements ou des conseils, et qui m'ont gentiment rendu service.

Et puis, je n'oublie pas de remercier mes collègues de bureau : **Fabien Morin**, que je remercie pour nos discussions intéressantes et ses multiples anecdotes, et pour nous avoir fait partager les gâteaux de Rosine et les croissants ! **Florentin Constancias**, qui a gentiment veillé à ce que ses collègues n'aient pas trop chaud dans le bureau et qui nous a permis de partager son bureau-chambre ; mais avant tout, merci pour ta sympathie et ton humour ; merci aussi pour ta disponibilité quand j'ai eu besoin d'aide. Je te souhaite bon courage pour ta fin de thèse.

Merci aussi à **Muhammad Abid** pour ces années d'études passées ensemble, nous avons pu partager nos expériences de doctorants, nous soutenir et nous entraider. J'espère que nos chemins se recroiseront un jour.

Pour terminer, je remercie **mes Parents** qui m'ont toujours soutenue et ont toujours été fiers de moi ce qui m'a permis d'en arriver là et de ne jamais baisser les bras. Merci pour toutes les valeurs essentielles que vous m'avez enseignées et qui me servent au quotidien.

Caroline, merci d'avoir toujours été là pour moi, et en particulier un grand merci pour tes renseignements grammaticaux et les corrections et suggestions que tu as pris le temps de faire sur ma synthèse bibliographique. Je sais que ça n'a pas été un travail très agréable et je te remercie de l'avoir fait consciencieusement. **Laurent**, merci pour ton aide, ton écoute et ton soutien ainsi que tous les bons moments passés ensemble. **Claudine** et **Marc**, merci, car même si vous n'avez pas bien compris ce que je faisais, au moins, j'ai pu me changer les idées en votre compagnie. Merci à Claudine pour la correction de l'anglais et à Marc pour m'avoir aidée avec application à la collecte des graines de *Medicago*.

Daniel et **Francine**, merci pour votre gentillesse et votre générosité et pour tous ces week-ends agréables qui m'ont changé les idées.

Enfin, **Romain**, merci de m'avoir soutenue et supportée au cours de ces trois ans. Merci pour tout ce que tu m'as apporté et qui a rendu chaque instant heureux.

RESUME

La compréhension des interactions qui associent les plantes et les microorganismes du sol est une étape incontournable pour une gestion durable de nos écosystèmes notamment en agriculture. Parmi les services écosystémiques résultant de leurs interactions, on peut citer la productivité végétale répondant, en partie, aux besoins alimentaires de la population mondiale et la régulation des cycles biogéochimiques. Les services écosystémiques, qui émergent de telles interactions, reposent sur des liens trophiques pouvant être représentés par un compromis entre coûts et bénéfices pour les différents partenaires de l'interaction. Les plantes, organismes autotrophes ou producteurs primaires, sont des organismes clefs qui font entrer le carbone dans l'écosystème, via la photosynthèse. Une partie de ce carbone est libérée sous forme de molécules plus ou moins complexes, au niveau de leurs racines, par le processus de rhizodéposition. Ces composés servent de molécules signal et de nutriments pour les microorganismes du sol, essentiellement hétérotrophes, c'est l'effet rhizosphère. Ce processus est donc coûteux pour la plante mais bénéfique aux microorganismes. Les microorganismes contribuent, en retour, à la nutrition et la santé des plantes ce qui est coûteux mais leur assure une source bénéfique de nutriments. Ces échanges trophiques reposent néanmoins sur un équilibre dépendant des conditions biotiques et abiotiques qui affectent chaque partenaire. La biodiversité microbienne, de par la multitude d'interactions au sein des communautés microbiennes, est un facteur biotique important. Parmi les facteurs abiotiques, le contexte environnemental actuel, soumis aux changements globaux, est propice à une déstabilisation de ces interactions.

L'objectif de ce travail est donc de comprendre comment vont varier les coûts et bénéfices, pour chaque partenaire, suite à des modifications de l'environnement affectant l'un ou l'autre. L'intérêt étant de savoir si les bénéfices pour les plantes et les microorganismes, qui permettent les services écosystémiques, seront affectés.

Pour répondre à cet objectif, un cadre d'interaction plantes-microbes simplifié a été choisi et une déstabilisation, au niveau de la plante, a été effectuée au moyen d'une augmentation en CO₂ atmosphérique. L'interaction entre *Medicago truncatula* et *Pseudomonas fluorescens* a ainsi été étudiée. Les interactions ont ensuite été complexifiées en utilisant une communauté microbienne dans son ensemble et, cette fois, la modification a été appliquée au compartiment microbien soumis à une dilution de sa diversité. L'effet du gradient de diversité microbienne obtenu a été mesuré sur la croissance et la reproduction de trois espèces végétales modèles (*Medicago truncatula*, *Brachypodium distachyon* et *Arabidopsis thaliana*). Enfin, l'analyse s'est focalisée sur la communauté microbienne en identifiant la part active, c'est-à-dire les microorganismes qui utilisent les composés libérés par la plante. Ces microorganismes, qui interagissent réellement avec la plante, ont été détectés grâce à une analyse ADN SIP utilisant l'isotope ¹³C.

Les principaux résultats observés, que la modification affecte l'un ou l'autre des partenaires, sont une déstabilisation des coûts et bénéfices. La première étude montre une variation temporaire des interactions en faveur de la plante en condition de CO₂ augmenté. Dans le cas d'une dilution de la diversité microbienne, les coûts pour la plante sont conditionnés par la dépendance naturelle des plantes vis-à-vis des microorganismes symbiotiques qui interagissent avec le reste de la communauté. Cela est confirmé par la dernière expérimentation qui met en évidence les interactions microbes-microbes qui conditionnent la structure de la communauté microbienne interagissant avec la plante.

Ce travail a permis de clarifier le fonctionnement des relations plantes-microorganismes du sol et les facteurs qui contribuent à leur maintien essentiel au fonctionnement des écosystèmes. Ces études apportent aussi des pistes en vue de pouvoir prédire les impacts des changements globaux sur nos écosystèmes. Conserver ou restaurer les services écosystémiques est indispensable pour le bien-être humain.

Mots clés : *Medicago truncatula*, interactions plantes-microbes, rhizosphère, relations coûts-bénéfices, symbiotes, changement global, biodiversité, ADN SIP

ABSTRACT

Understanding the interactions that bind plants and soil microorganisms is an essential step for the sustainable management of ecosystems, especially in agriculture. The ecosystem services resulting from such interactions include plant productivity which responds, in part, to the food requirements of the world's population and the regulation of biogeochemical cycles. These ecosystem services depend on trophic links between the two partners in the interaction and can be represented by a tradeoff between the costs and benefits for each partner. Plants, being autotrophic organisms or primary producers, are key organisms which introduce carbon into the ecosystem, through photosynthesis. Part of this carbon is released as more or less complex molecules at the roots level, thanks to the rhizodeposition process. These compounds act as signal molecules and nutrients for soil microorganisms, which are mainly heterotrophic, in the so-called rhizosphere effect. This process is costly for the plant but beneficial to the microorganisms. In return, microorganisms contribute to plant nutrition and health, which is costly but provides them with a beneficial source of nutrients. These trophic exchanges, however, are based on a balance which depends on the biotic and abiotic conditions that affect each partner. Microbial biodiversity, through the multitude of interactions occurring within microbial communities, is a significant biotic factor. Among the abiotic factors, the current environmental context, subject to global change, is tending to destabilize these interactions.

The objective of this work was to understand how environmental changes affect the costs and benefits for each partner by applying changes to one or the other, the aim being to determine whether these changes would affect the benefits for plants and microorganisms that provide ecosystem services.

To achieve this objective, a simplified framework for plants-microbes interaction was first chosen. Destabilization at the plant level was carried out by increasing the atmospheric CO₂ and studying the interaction between *Medicago truncatula* and *Pseudomonas fluorescens*. The interactions were then made more complex by using a whole microbial community but this time the change was applied to the microbial compartment by subjecting it to diversity dilution. The effect of the resulting microbial diversity gradient was measured on the growth and reproduction of three model plant species (*Medicago truncatula*, *Brachypodium distachyon* and *Arabidopsis thaliana*). Finally, the microbial community was subjected to a DNA SIP analysis, with the isotope ¹³C, to identify the active portion, i.e., those microorganisms which really interacted with the plant and used compounds released by it.

The main result, when the change affected one or other partner, was a destabilization of the costs and benefits. The first study showed a transient variation in the interactions in favour of the plant under increased CO₂ conditions. In the case of a dilution of microbial diversity, the costs for the plant are conditioned by the natural dependency of plants on symbiotic microorganisms that interact with the rest of the community. This was confirmed by the last experiment that highlighted the between-microbes interactions which determined the composition of the microbial community that interacted with the plant.

This work has helped to clarify the functioning of relationships between plants and soil microbes and the factors that contribute to their maintenance which is essential to the functioning of ecosystems. These studies also provide ways for predicting the impacts of global change on ecosystems. The conservation or restoration of ecosystem services is essential for human well-being.

Keywords: *Medicago truncatula*, plants-microbes interactions, rhizosphere, costs-benefits relationship, symbionts, global change, biodiversity, DNA SIP

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE DE LA THESE	9
CADRE SCIENTIFIQUE DU PROJET DE THESE	13
Préambule	14
Sommaire	15
Effets des changements globaux sur un partenariat essentiel au fonctionnement de l'écosystème : les interactions plantes-microorganismes telluriques	16
Conclusion du cadre scientifique du projet de thèse	86
CHAPITRE I.....	89
Préambule	90
Sommaire	92
Interaction between <i>Medicago truncatula</i> and <i>Pseudomonas fluorescens</i> : Evaluation of costs and benefits across an elevated atmospheric CO ₂	93
Conclusion du Chapitre I	122
CHAPITRE II	125
Préambule	126
Sommaire	128
Diversity decreasing of the rhizospheric microbial community: growth and fitness of three plant species and their symbionts	129
Conclusion du Chapitre II	169
CHAPITRE III	173
Préambule	174
Sommaire	176
Identification des communautés microbiennes actives au sein de la rhizosphère de <i>Medicago truncatula</i> , en symbiose ou non	177
Conclusion du Chapitre III.....	210
CONCLUSION GENERALE DE LA THESE	213
PERSPECTIVES	221
BIBLIOGRAPHIE	225
LISTE DES TABLEAUX.....	255
LISTE DES FIGURES	256

INTRODUCTION GENERALE DE LA THESE

INTRODUCTION GENERALE DE LA THESE

Ce travail de thèse, réalisé à l'Institut National de la Recherche Agronomique, s'intéresse à des enjeux de sociétés majeurs résidant dans la gestion des agroécosystèmes de façon durable. Dans le contexte mondial actuel (Supit et al 2012), il devient préoccupant de gérer les agroécosystèmes de façon à préserver l'environnement tout en maintenant leur rôle primordial dans l'alimentation (MEA 2005b ; Nelson 2005b ; Tilman et al 2001b). Le fonctionnement des végétaux qui constituent ces agroécosystèmes doit donc être pris en compte (MEA 2005a). Or, dans cette optique de développement durable, le compartiment végétal ne peut être dissocié du compartiment sol dans lequel il puise les éléments nutritifs nécessaires à sa croissance et à son développement (van der Heijden et al 2008). Les microorganismes du sol sont essentiels à la nutrition et la santé des plantes (Bever et al 2012 ; Whipps 2004). C'est la résultante de l'interaction entre ces deux compartiments qui est à l'origine des services agroécosystémiques (Cortois & De Deyn 2012 ; Wu et al 2009). Ces interactions reposent sur des liens trophiques, soumis à un compromis entre les coûts métaboliques fournis par le partenaire et les services rendus par l'autre partenaire (composés carbonés de la plante permettant la croissance microbienne *versus* métabolites microbiens contribuant à la croissance et la santé des plantes) (Morgan et al 2005). Dans un contexte fortement perturbé par les activités humaines, il devient essentiel de comprendre comment vont être affectés les plantes, les microorganismes et leurs interactions en s'appuyant sur cette vision coûts-bénéfices. Parmi les changements globaux, résultant en partie des perturbations anthropiques, qui affectent nos écosystèmes, on peut citer l'augmentation des gaz à effets de serre, la hausse des températures ou encore les modifications du cycle de l'eau (IPCC 2001, 2007). En raison de leur mobilité réduite, les plantes vont subir ces modifications environnementales et entraîner des répercussions sur les microbes du sol. Cela peut conduire à des variations de leurs interactions et donc affecter les services écosystémiques.

L'objectif a alors été, dans un premier temps, de faire l'état des lieux de la littérature concernant le comportement des interactions plantes-microorganismes affectées par les changements globaux. Cette **synthèse bibliographique**, après avoir présenté les interactions plantes-microorganismes et énuméré les services écosystémiques rendus par les plantes, les microorganismes du sol et leurs interactions, s'est focalisée sur certains aspects du changement global (augmentation de la concentration en CO₂, hausse des températures,

disponibilité en eau et en nutriments). Les principales conséquences de ces variations environnementales ont ainsi été décrites. La littérature met en avant une grande variabilité des coûts et bénéfices régissant les interactions plantes-microbes en raison de la diversité et la complexité de ces interactions.

Les trois chapitres qui suivent décrivent les différentes stratégies d'études, employées dans ce travail de thèse, afin d'étudier les interactions plantes-microbes et microbes-microbes. Ces stratégies divergent par les systèmes d'interactions plantes-microorganismes telluriques utilisés ainsi que par les modifications environnementales, reflétant les changements globaux, qui ont été appliquées.

Le **premier chapitre** s'intéresse aux effets d'une hausse de la concentration en CO₂ atmosphérique, à 750 parties par millions, sur l'interaction entre une légumineuse modèle, *Medicago truncatula*, et la bactérie mutualiste *Pseudomonas fluorescens*. Cette étude vise à comprendre l'interaction en appliquant une modification au niveau de la plante via le CO₂. L'étude, réalisée dans des conditions gnotobiotiques, est alors simplifiée à l'interaction entre un génotype végétal et un génotype microbien. Les variations de coûts et bénéfices ont été analysées suite à cette hausse du CO₂ atmosphérique. L'interaction des deux partenaires est perturbée par l'enrichissement en CO₂ ce qui permet d'apporter des éléments de compréhension et de nouvelles questions sur le fonctionnement de cette interaction.

Le **deuxième chapitre** conserve le même objectif de compréhension des interactions plantes-microbes mais cette fois la modification est apportée au niveau des microorganismes. Une réduction de diversité de la communauté microbienne interagissant avec la plante est réalisée de façon expérimentale, afin de mimer une perte de biodiversité souvent observée suite aux changements globaux, en particulier suite aux perturbations liées aux pratiques agricoles. Cette étude vise à découpler l'effet des microorganismes en interaction intime avec la plante, les symbiotes, par rapport au reste de la communauté microbienne, sur la croissance, le développement et la reproduction végétale. Pour cela, trois espèces de plantes dépendant plus ou moins de symbiotes ont été utilisées, *Medicago truncatula*, *Brachypodium distachyon* et *Arabidopsis thaliana*. La diversité de la communauté microbienne a été diluée progressivement de façon à obtenir un gradient de diversité. Les symbiotes ont été ajoutés, quand nécessaire, afin de mettre en évidence leur rôle par rapport au reste de la communauté microbienne. L'étude s'intéresse alors aux variations de coûts et bénéfices pour la plante et les

microbes selon le niveau de diversité ainsi qu'à l'implication des symbiotes dans ces variations. Il s'avère que, dans notre étude, la dépendance vis-à-vis des symbiotes conditionne la réponse de chaque espèce végétale à une baisse de la diversité microbienne.

Le **troisième chapitre** vise à approfondir la compréhension des interactions plantes-microbes en identifiant les microorganismes impliqués dans la dégradation des composés carbonés libérés par *Medicago truncatula*. Cette expérimentation repose sur une technique de marquage isotopique au ^{13}C de l'ADN, la méthode ADN-Sip (ADN-Stable isotope probing) (Dunford & Neufeld 2010). Le CO_2 fourni à la plante a donc été marqué, puis son devenir dans le sol a été étudié, via l'analyse des microorganismes ayant utilisé les composés carbonés fournis par la plante et constituant ainsi la part active de la communauté microbienne. Le rôle des symbiotes a été découplé de celui du reste de la communauté microbienne grâce à l'utilisation de deux génotypes de *Medicago truncatula* : le génotype sauvage, J5, qui a la capacité d'établir des interactions symbiotiques et un génotype mutant de *Medicago truncatula*, TRV25, dépourvu d'associations symbiotiques. L'analyse des communautés microbiennes, au sein de la rhizosphère des deux génotypes de *Medicago truncatula*, a été réalisée par des approches d'écologie moléculaire.

L'ensemble des expérimentations, constituant ce travail de thèse, s'articule donc autour de plusieurs disciplines telles que l'écophysiologie végétale, l'écologie microbienne et l'écologie évolutive. L'objectif est de mieux comprendre le fonctionnement des interactions entre les compartiments végétal et microbien de nos écosystèmes, et, en particulier l'effet des changements globaux sur ces interactions. Des études complémentaires dans ce domaine sont nécessaires afin d'inclure l'ensemble des interactions plantes-microorganismes fondamentales à nos écosystèmes. A plus long terme, l'enjeu de telles études serait de pouvoir définir quelques généralisations, aidant à prédire les effets des changements globaux, sur ces interactions. Cette démarche permettrait de pallier ces effets et de sauvegarder ou restaurer ces interactions fondamentales au fonctionnement des écosystèmes.

CADRE SCIENTIFIQUE DU PROJET DE THESE

- Synthèse bibliographique -

**Effets des changements globaux sur un partenariat essentiel au
fonctionnement de l'écosystème : les interactions plantes-microorganismes
telluriques**

CADRE SCIENTIFIQUE DU PROJET DE THESE

- Synthèse bibliographique -

Effets des changements globaux sur un partenariat essentiel au fonctionnement de l'écosystème : les interactions plantes-microorganismes telluriques

Préambule

Le cadre scientifique du projet de thèse constitue une synthèse de la bibliographie portant sur les effets des changements globaux concernant les interactions plantes-microorganismes du sol. Cette partie explicite d'abord le fonctionnement des interactions plantes-microbes en présentant une brève description du métabolisme végétal puis en décrivant le compartiment microbien avec lequel la plante interagit. Une synthèse des différentes interactions existant entre les deux partenaires met en évidence la base trophique de ces interactions qui constituent des coûts et bénéfices pour chacun. Les services écosystémiques apportés par chaque partenaire sont ensuite détaillés et mettent en évidence la susceptibilité des interactions plantes-microbes par rapport aux différents aspects des changements globaux qui affectent nos écosystèmes. Enfin, diverses expérimentations s'intéressant aux effets des changements globaux sur les compartiments végétal et microbien sont réunies afin de représenter les principales conséquences existant et la résultante sur leurs interactions et donc sur les services écosystémiques qui en découlent. Pour finir, les perspectives reposent sur le rôle important de ces interactions dans le fonctionnement de nos écosystèmes avec un intérêt particulier pour les agroécosystèmes. Néanmoins, la difficulté d'étudier ces interactions et de faire des généralisations est mise en évidence.

Cette synthèse bibliographique a été intégrée en partie à un **chapitre de livre** intitulé « Combining molecular microbial ecology with ecophysiology and plant genetics for a better understanding of plant-microbial communities interactions in the rhizosphere. ». Ce chapitre de livre sera intégré dans la section « Focus chapters » de l'ouvrage intitulé « Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere » et publié par Frans J. de Bruijn aux éditions Wiley-Blackwell en 2013.

Sommaire

1. Fonctionnement des interactions plantes-microorganismes telluriques	16
1.1. Base trophique des interactions et approche coûts-bénéfices	16
1.1.1. Le métabolisme végétal et l'effet rhizosphère	16
1.1.2. Les relations trophiques dans la rhizosphère : vision coûts-bénéfices	19
1.1.3. Caractéristiques des échanges rhizosphériques dirigés par la plante	21
1.2. La communauté microbienne rhizosphérique	22
1.2.1. Etablissement de la communauté microbienne dans la niche rhizosphérique.....	22
1.2.2. Microorganismes symbiotiques.....	23
1.2.3. Microorganismes non symbiotiques.....	28
1.3. La biodiversité microbienne	31
1.3.1. Interactions entre microorganismes et effets sur la plante	31
1.3.2. Richesse spécifique vs fonctionnelle	32
1.3.3. Assurance écologique.....	33
2. Des services écosystémiques remis en cause par les changements globaux	35
2.1. Intérêt écologique des compartiments végétal et microbien	35
2.2. Services écosystémiques émergeant de l'interaction plantes-microbes.....	38
2.3. Les changements globaux	40
3. Conséquences des changements globaux sur l'association plantes-microbes.....	43
3.1. Effets sur les plantes.....	43
3.1.1. Hausse de la concentration en CO ₂	43
3.1.2. Augmentation des températures	45
3.1.3. Disponibilité en eau.....	47
3.1.4. Disponibilité en nutriments	48
3.2. Effets sur les microorganismes.....	50
3.2.1. Abondance des microorganismes	51
3.2.2. Diversité microbienne	52
3.2.3. Activité des microorganismes	53
3.2.4. Composition des communautés microbiennes	54
3.3. Evolution des interactions plantes-microorganismes.....	57
4. Perspectives.....	59
4.1. Un système complexe avec de multiples interactions	59
4.2. Systèmes expérimentaux d'étude des interactions plantes-microbes	61
4.3. Perspectives environnementales.....	62
5. Bibliographie	64

Effets des changements globaux sur un partenariat essentiel au fonctionnement de l'écosystème : les interactions plantes-microorganismes telluriques

1. Fonctionnement des interactions plantes-microorganismes telluriques

1.1. Base trophique des interactions et approche coûts-bénéfices

1.1.1. Le métabolisme végétal et l'effet rhizosphère

Les plantes sont des organismes autotrophes c'est-à-dire qu'elles n'ont pas besoin d'une source de carbone organique pour réaliser leur croissance mais qu'elles vont synthétiser leur propre matière organique suite au processus de photosynthèse. La photosynthèse met en jeu des pigments chlorophylliens captant l'énergie lumineuse et permet la synthèse de matières organiques à partir d'une source de carbone inorganique, le dioxyde de carbone (CO_2), de l'eau et des nutriments (Ziska & Bunce 2006). Ces quatre facteurs abiotiques (lumière, CO_2 , nutriments, eau) sont essentiels à la croissance végétale. De plus, les échanges gazeux nécessaires au fonctionnement de la plante, tels que l'absorption de CO_2 et le rejet d'oxygène (O_2), sont rendus possible grâce à des structures spécifiques localisées au niveau des feuilles, les stomates. Or le fonctionnement des stomates, et le métabolisme photosynthétique qui en découle, dépendent de la température externe (Luo 2007). La température est donc le cinquième élément abiotique fondamental dans la réalisation de la photosynthèse et joue également un rôle important dans la régulation du développement végétal. Les stades de développement des plantes (ouverture des feuilles, apparition des fleurs, durée du stade végétatif,...) sont en partie déterminés par la température (Menzel 2000 ; Menzel et al 2003 ; Walther et al 2002). La phénologie des plantes est ainsi décrite comme le caractère saisonnier de l'activité végétale (Menzel et al 2006). C'est cette influence de la température qui est d'ailleurs exploitée lors de la vernalisation des graines qui consiste à exposer les graines à de faibles températures ce qui permet par la suite une apparition plus précoce des fleurs et de la production de graines (Chabaud et al 2006).

Ce schéma global du fonctionnement de la plante comporte trois variantes dépendant du mode de fixation du CO_2 lors de la photosynthèse. La majorité des plantes ont un métabolisme C_3 c'est-à-dire qu'elles vont fixer le CO_2 grâce à une seule enzyme, la Rubisco. Cependant, la Rubisco est également capable de fixer l' O_2 au lieu du CO_2 , via la photorespiration. Ce phénomène entraîne une baisse du taux photosynthétique du fait de la

fixation d'O₂ à la place du CO₂. Les plantes peuvent ainsi respirer jusqu'à 50 % du carbone disponible pour la photosynthèse (Luo 2007). Environ 4 % des espèces végétales connues ont un métabolisme C4 (Ziska & Bunce 2006). Les espèces en C4 effectuent une séparation spatiale entre la fixation du CO₂ et son utilisation et comportent deux enzymes distinctes qui sont la PEPcase et la Rubisco. La fixation de CO₂ va donc être plus efficace puisque c'est la PEPcase qui se charge de fixer uniquement le CO₂ et de l'apporter à la Rubisco. Le reste des végétaux qui ne fonctionnent pas selon le modèle C3 ou C4, représentent environ 1 % des espèces végétales et ont un métabolisme appelé métabolisme acide crassulacéen (CAM) (Ziska & Bunce 2006). Les plantes CAM ont les deux mêmes enzymes que les plantes en C4 mais la fixation du CO₂ et son utilisation sont séparées dans le temps, ce qui permet à la plante de se concentrer sur l'accumulation du CO₂ durant la nuit et de le transformer efficacement le jour.

La photosynthèse entraîne la transformation du carbone minéral sous forme de glucides, généralement de l'amidon et/ou du saccharose et plus rarement des sucres tels que le glucose et le fructose (Heller et al 1993). Ces glucides vont constituer des réserves temporaires puis une partie servira de base pour la production de molécules plus complexes (protides, lipides, acides aminés, acides organiques, ...) permettant à la plante de synthétiser sa biomasse aérienne et racinaire. Le reste des produits synthétisés va être stocké dans les racines sous forme de réserves (Heller et al 1993). Cependant, une fraction des photosynthétats, estimée en moyenne à 17 % du C net fixé par la photosynthèse, n'est pas directement utilisée par la plante pour sa propre croissance mais va être acheminée jusqu'aux racines et libérée dans le sol (Nguyen 2003). On désigne sous le nom de rhizosphère les racines et la zone de sol entourant les racines et étant sous l'influence du métabolisme de la plante (Figure 0.1). La rhizosphère se décompose en trois zones : l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface des racines) et l'ectorhizosphère (sol adhérent aux racines ou sol rhizosphérique). La plante va donc libérer au sein de la rhizosphère divers éléments carbonés, dont les photosynthétats, regroupés sous le terme de rhizodépôts. Les rhizodépôts sont composés des exsudats racinaires (ou photosynthétats : sucres, acides aminés, acides organiques, hormones, vitamines), de sécrétions de mucilage (sucres polymérisés, enzymes) et de cellules sénescents (cellules de la coiffe racinaire, cellules corticales et épidermiques) puis de l'ensemble de la racine à la mort de la plante (Lynch & Whipps 1990 ; Nguyen 2003).

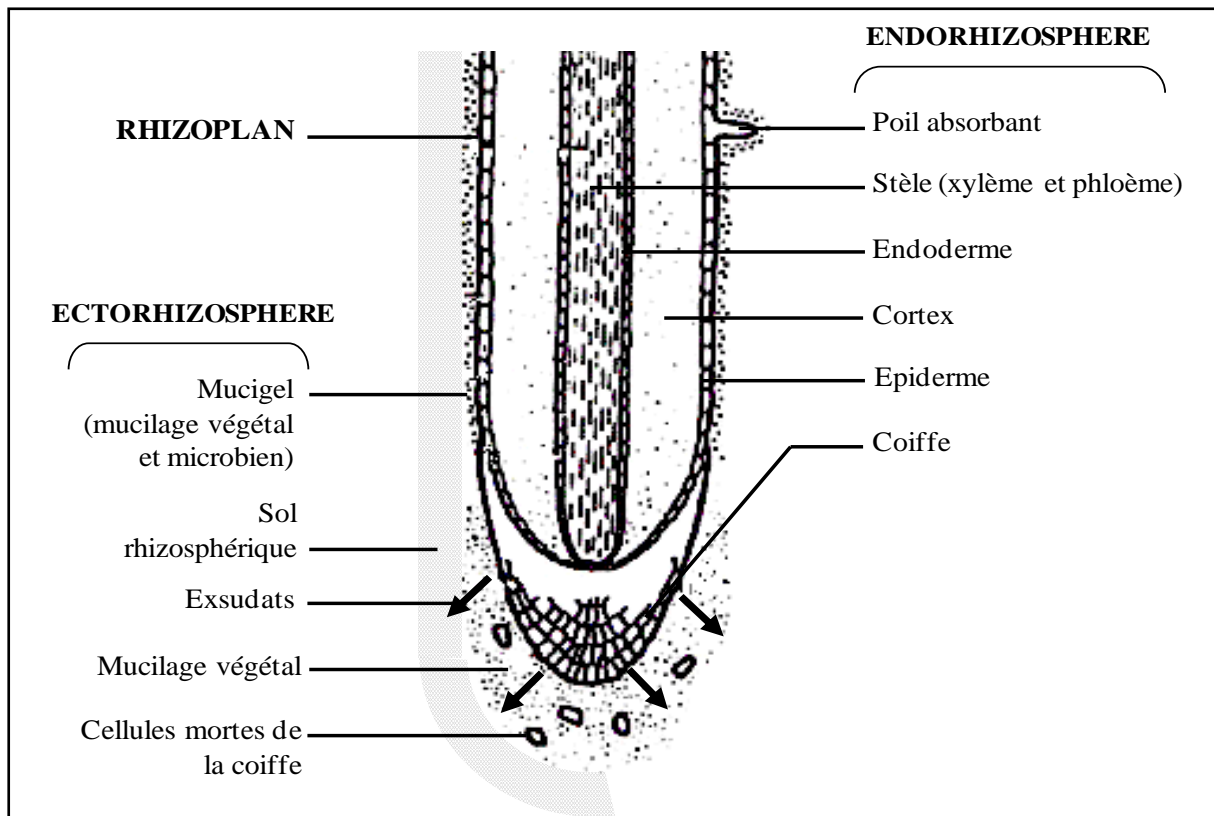


Figure 0.1 Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère (D'après Lynch 1983). La rhizosphère se décompose en trois régions qui sont l'endorhizosphère (tissus racinaires), le rhizoplan (surface des racines) et l'ectorhizosphère (sol adhérent aux racines ou sol rhizosphérique).

Le sol est un milieu vivant composé de nombreux microorganismes, essentiellement hétérotrophes, c'est-à-dire qui ont besoin d'une source de carbone organique pour réaliser leur croissance. La libération de carbone organique dans la rhizosphère constitue une source importante de nutriments pour ces microorganismes. Cette interaction trophique est à la base de l'effet rhizosphère (Figure 0.4).

1.1.2. Les relations trophiques dans la rhizosphère : vision coûts-bénéfices

Le carbone perdu par la plante au niveau des racines lors de la rhizodéposition représente de 0,6 à 27 % de sa masse sèche (Nguyen 2003). Ce carbone ne sera pas utilisé pour la croissance végétale et correspond donc à un coût en C pour la plante (Nguyen 2003). Cependant, ces composés seront utilisés par les microorganismes hétérotrophes du sol qui vont les métaboliser et ainsi trouver la source d'énergie nécessaire à leur croissance. Or, si ce processus de rhizodéposition, énergiquement coûteux pour la plante et qui semble bénéficier uniquement aux microorganismes hétérotrophes de la rhizosphère, a été maintenu au cours de l'évolution des végétaux c'est que les coûts investis doivent être compensés par des bénéfices (Morgan et al 2005). En effet, les microorganismes rhizosphériques vont contribuer à fournir des éléments minéraux nécessaires à la croissance de la plante. L'interaction entre la plante et les microorganismes, au sein de la rhizosphère, est donc basée sur des échanges trophiques (van der Heijden et al 2008) impliquant des coûts et des bénéfices pour chaque partenaire. En effet, les composés échangés entre les deux partenaires représentent des coûts pour celui qui les produit mais un bénéfice pour celui qui les reçoit. Les bénéfices représentent les biens et les services qu'un organisme ne peut pas obtenir ou qui lui sont difficiles à obtenir en l'absence d'un autre organisme. Cela inclut notamment l'acquisition de nutriments, et la protection contre les facteurs biotiques et abiotiques de l'environnement. Les coûts incluent les investissements qu'un organisme met en place pour attirer son partenaire et les composés qu'il doit fournir à son partenaire pour que l'interaction subsiste (Holland et al 2004). Dans le cas de l'interaction plante-microorganismes, le coût associé à la perte de composés carbonés par les racines va permettre la croissance des populations microbiennes au sein de la rhizosphère ou le maintien d'associations microbiennes spécifiques. C'est là qu'intervient le bénéfice, pour la plante, associé à cette perte de carbone. En effet, les microorganismes peuvent contribuer, entre autre, au recyclage des éléments dans la rhizosphère pour en faire des nutriments assimilables par la plante (van der Heijden et al 1998, 2006a,b ; Vogelsang et al 2006), à la production d'hormones végétales (Dobbelaere et al 1999 ; Patten & Glick 1996) ou encore à la protection contre les pathogènes (Eparvier et al 1991 ; Landa et al 2003 ; van Loon et al 1998 ; Whipps 2004). Il y a donc une compensation entre les coûts et les bénéfices. En ce qui concerne les microorganismes, la production des éléments minéraux fournis à la plante hôte représente un coût métabolique pour les microorganismes telluriques ; de même que l'énergie mise en œuvre par le microbe pour assurer un rôle de protection contre les maladies végétales, notamment lors de la compétition avec des pathogènes de la plante hôte. Cependant, il y a un bénéfice à interagir avec la plante puisque celle-ci leur fournit des

composés carbonés ce qui leur assure une source de nutriments pour leur croissance. Les coûts pour chaque organisme vont ainsi être compensés par les bénéfices que chacun reçoit de l'autre organisme. Il se crée un équilibre au niveau de la balance coûts-bénéfices qui résulte d'une co-évolution entre les deux partenaires et qui contribue au maintien de cette interaction (Bever et al 2009 ; Denison & Kiers 2004a) (Figure 0.2). Une telle stabilité apparente de ces interactions réciproquement bénéfiques masque souvent un conflit d'intérêt (Douglas 2008 ; Johnstone & Bshary 2008). En effet, ces coûts et bénéfices ne sont pas des traits fixés mais ils vont varier avec l'abondance et la densité de chacun des partenaires. De plus ce feedback positif entre les deux populations qui interagissent va dépendre des facteurs environnementaux qui peuvent perturber ces interactions et modifier cet équilibre (Holland et al 2004). Ces coûts et bénéfices varient également en fonction du type de microorganismes présents dans la rhizosphère ; leur interaction vis-à-vis de la plante pouvant être positives, négatives ou neutres.

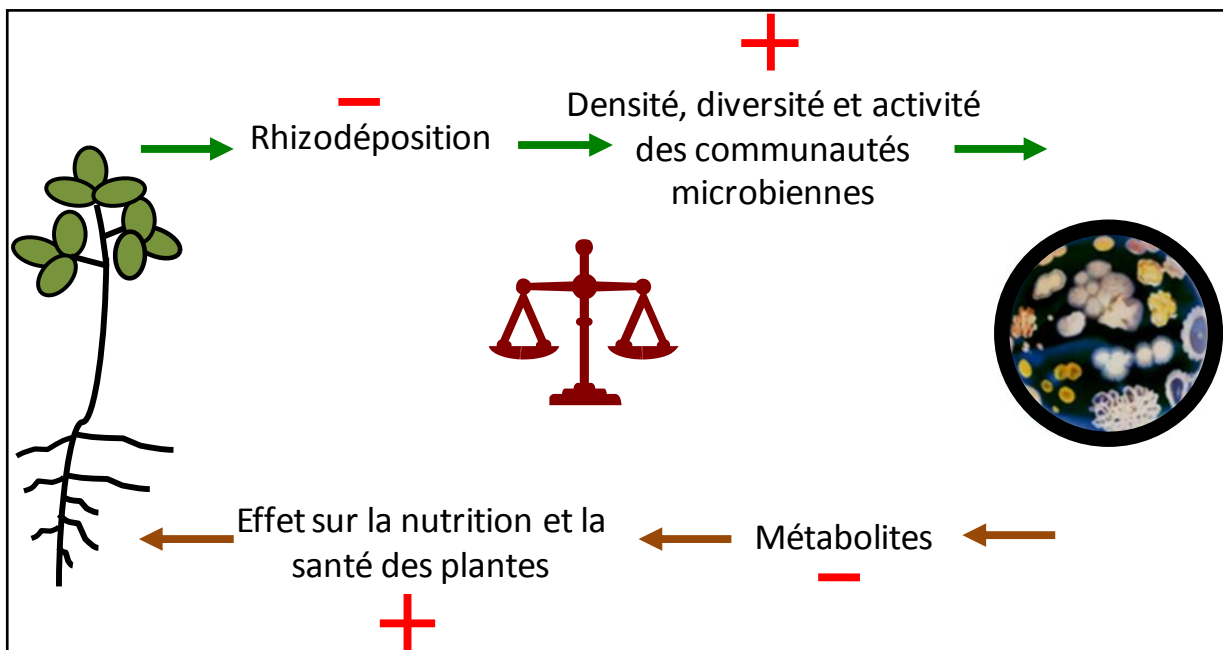


Figure 0.2 Vision coûts-bénéfices de l'interaction plantes-microorganismes mutualistes. Les coûts pour la plante et les microorganismes sont compris dans les processus respectifs de rhizodéposition et de production de métabolites. Ces coûts sont compensés par les bénéfices que chacun reçoit de l'autre partenaire, une influence positive de la plante sur la densité, la diversité et l'activité des communautés microbiennes et une influence positive des microorganismes sur la nutrition et la santé des plantes.

1.1.3. Caractéristiques des échanges rhizosphériques dirigés par la plante

Les échanges trophiques qui ont lieu au sein de la rhizosphère sont en premier lieu dirigés par la plante puisque c'est elle qui intègre l'élément carbone dans le compartiment sol via la rhizodéposition. Or cette production de rhizodépôts est variable dans l'espace et dans le temps (Bardgett et al 2005).

La photosynthèse se déroule au niveau de la partie aérienne (organe source) et les photosynthétats sont acheminés vers le compartiment racinaire (organe puits) et une fraction va être libérée dans le sol. Ce trajet implique donc qu'on trouve une plus forte concentration de composés carbonés au niveau de l'endosphère que du rhizoplan, et l'ectosphère (ou sol rhizosphérique) est le dernier compartiment à recevoir les composés carbonés (Mougel et al 2006).

Le stade de croissance et de développement de la plante a un impact considérable sur la quantité et la nature des composés carbonés libérés par la plante (Kuzyakov & Domanski 2000 ; Yu et al 2012). Les différents types de rhizodépôts ne sont pas libérés en même temps mais sont répartis au cours de la croissance de la plante. La libération de sucres intervient principalement durant la germination de la graine alors que les cellules sénescents seront libérées chez une plante mature jusqu'à la mort de la plante entière (Lynch & Whipps 1990).

L'espèce végétale entre aussi en compte dans la quantité (Gill & Jackson 2000) et la composition (teneur en carbone,...) des rhizodépôts (Bever et al 2012). Kuramae et al (2012) mettent en évidence une très faible abondance microbienne dans les sols de forêts de type conifères du au fait que les composés carbonés rejetés par les arbres sont complexes et difficiles à dégrader pour les microorganismes. De plus, la taille, la morphologie de la racine et son fonctionnement vont être déterminés génétiquement et physiologiquement (Nguyen 2003 ; Schulz 2012).

Les conditions environnementales extérieures dont dépend le fonctionnement de la plante ainsi que les caractéristiques physiques du sol vont aussi modifier la quantité et la nature des composés carbonés. Dans sa méta-analyse, Nguyen (2003) montre, par exemple, que la rhizodéposition est plus importante dans un sol riche en argile car il a une meilleure rétention d'eau, une stabilisation de la matière organique et une meilleure capacité d'échanges cationiques.

1.2. La communauté microbienne rhizosphérique

1.2.1. Etablissement de la communauté microbienne dans la niche rhizosphérique

La niche rhizosphérique représente un habitat propice à la colonisation microbienne. Cependant ces microorganismes ne sont pas répartis aléatoirement dans le sol. Le sol est un milieu hétérogène agissant parfois comme un filtre empêchant certains microorganismes de s'installer (Decaëns 2010). Ainsi, des filtres environnementaux, tels que la physicochimie du sol ou encore la teneur en nutriments, déterminent la capacité des microorganismes à s'établir au sein de la rhizosphère. Dans leur étude, Schutter et al (2001) comparent différents types de sol selon leur teneur en argile, limon et sable. Ils montrent que le type de sol est un facteur déterminant dans le contrôle de la biomasse et l'activité microbienne. Ils en concluent que la structure de la communauté ainsi que son potentiel d'utilisation des rhizodépôts sont davantage affectés par le type de sol que par les saisons ou encore le mode de gestion du sol. Le pH est aussi un filtre environnemental important. Ainsi, les sols acides ont une faible biomasse microbienne (Dequiedt et al 2011 ; Kuramae et al 2012).

Des filtres biotiques, tels que l'affinité avec la plante (Bezemer et al 2010) et les interactions entre les microorganismes eux-mêmes, ont aussi un impact dans l'établissement d'une communauté microbienne. Certaines espèces sont plus compétitives que d'autres et réussissent mieux à s'implanter dans la rhizosphère. Cela peut être dû à leur meilleure capacité à utiliser les nutriments du milieu ou à passer au travers des filtres environnementaux (van der Heijden et al 2008).

Quand ils sont établis au sein de la rhizosphère, les microorganismes vont pouvoir interagir plus ou moins fortement avec la plante. Ainsi, le trajet emprunté par les photosynthétats de la plante jusqu'au sol va conduire à une spatialisation de la ressource fournie par la plante et donc à une spéciation des microorganismes selon leur place sur ce trajet et leur utilisation des rhizodépôts (Mougel et al 2006). On distingue donc les microorganismes symbiotiques qui sont situés à l'intérieur ou à la surface des racines, ils dépendent entièrement de la plante pour leur survie (Wardle et al 2004) et les microorganismes non symbiotiques ou libres qui sont présents au niveau du sol rhizosphérique; pour eux l'association avec une plante n'est pas indispensable. Ainsi, une partie des photosynthétats va servir de signaux moléculaires indispensables à l'établissement des relations symbiotiques. Une autre partie va soit servir de nutriments pour les symbiotes, soit être libérée dans le sol par les racines selon le processus de rhizodéposition au niveau de la rhizosphère et être ainsi disponible pour les microorganismes non-symbiotiques. La

rhizosphère est donc un milieu dynamique et structuré. Elle abrite une multitude de microorganismes interagissant de diverses façons avec la plante et qui sont structurés en communautés complexes dans lesquelles diverses interactions entre les microorganismes eux-mêmes existent. On peut ainsi différencier les microorganismes rhizosphériques en deux groupes se distinguant par le niveau d'interdépendance qui existe entre la plante et les microorganismes ; les microorganismes symbiotiques et les non symbiotiques (Figure 0.4). Au sein de chaque groupe, il existe divers microbes qui se distinguent par leur effet sur la plante : positif, négatif ou neutre (Wardle et al 2004).

1.2.2. Microorganismes symbiotiques

La plante est donc la principale force structurante des communautés microbiennes. On estime qu'environ 20 000 espèces de plantes (sur environ 300 000) seraient entièrement dépendantes d'organismes microbiens pour leur croissance et leur survie (van der Heidjen et al 2008). Cette dépendance implique la mise en place de systèmes de reconnaissance et de fonctionnement entre la plante et les microorganismes qui doivent être régulés afin que l'association ait lieu ; cela va donc conduire à une spécificité des associations entre la plante et les microorganismes dits symbiotiques. Les symbiotes mettent en place des mécanismes de reconnaissance de la plante hôte appropriée qui leur fournira les nutriments nécessaires (Brennic & Winans 2005). Ils vont ensuite induire des changements physiologiques chez la plante hôte de par leur activité spécifique au sein de cette plante puis vont à leur tour ajuster leur propre physiologie pour réaliser leur activité. L'interaction va donc reposer sur des échanges de signaux très coordonnés entre la plante et le microorganisme, conduisant ainsi à des ajustements physiologiques graduels qui permettent la mise en place de la symbiose (Brennic & Winans 2005). Les plantes vont, ainsi, produire des métabolites secondaires (sucres, acides-aminés, composés aromatiques,...) qui vont agir comme une source d'attraction pour les microbes. Les microorganismes vont synthétiser des protéines leur permettant de détecter les signaux chimiques venant de la plante. Afin que la bactérie se fixe au niveau de la racine pour établir une interaction avec la plante hôte, des protéines végétales (lectines) sont libérées par la plante et agissent comme des récepteurs des composés libérés par les microorganismes. Ces substances libérées par la plante et impliquées dans le chimiotactisme vont alors induire l'expression de gènes bactériens qui vont permettre la mise en place des interactions (Brennic & Winans 2005).

Les microorganismes symbiotiques sont dits mutualistes quand ils ont un effet bénéfique sur la nutrition et/ou la santé des plantes avec lesquelles ils interagissent. De tels

microorganismes fournissent à la plante des éléments limitants pour sa croissance et qu'elle prélève en quantité insuffisante par rapport à ses besoins ou qu'elle n'aurait pas pu acquérir seule. C'est le cas, par exemple, dans la symbiose plante-*Rhizobium* conduisant à la formation de nodules racinaires dans lesquels s'établissent les rhizobia afin de fixer l'azote atmosphérique (Figure 0.3). La protéine Nod de la rhizobactérie va reconnaître les composés aromatiques (généralement des flavonoides) libérés par la plante. La plante va alors détecter les facteurs Nod sécrétés par la bactérie et internaliser cette bactérie. La division cellulaire au sein de la plante est ensuite induite par les facteurs Nod créant le nodule. Les rhizobia vont ainsi pouvoir fixer l'azote atmosphérique (N_2) et le transformer en ammonium, directement assimilable par la plante (Young et al 2003). Il en est de même pour l'approvisionnement en phosphore des plantes mycorhizées. Les champignons mycorhiziens de type arbusculaire (AMF : Arbuscular Mycorrhizal Fungi) vont s'établir dans les racines puis capter le phosphore qui se trouve dans le sol, le transporter le long de leurs hyphes et ensuite le délivrer à la plante hôte (Bever et al 2012). Ces interactions bénéfiques avec le symbiote mutualiste stimulent aussi des mécanismes de défense contre les parasites (Landa et al 2003 ; van Loon et al 1998) et les pathogènes (Whipps 2004). Certains éléments minéraux du sol, en revanche, sont toxiques pour la plante comme, par exemple, les métaux lourds (Cadmium, Plomb) quand ils sont présents dans le sol sous forme dissoute. Dans certains cas, des microorganismes peuvent les accumuler et les dégrader, évitant ainsi la toxicité pour la plante (Bakker et al 2007 ; Kuiper et al 2004 ; Morgan et al 2005).

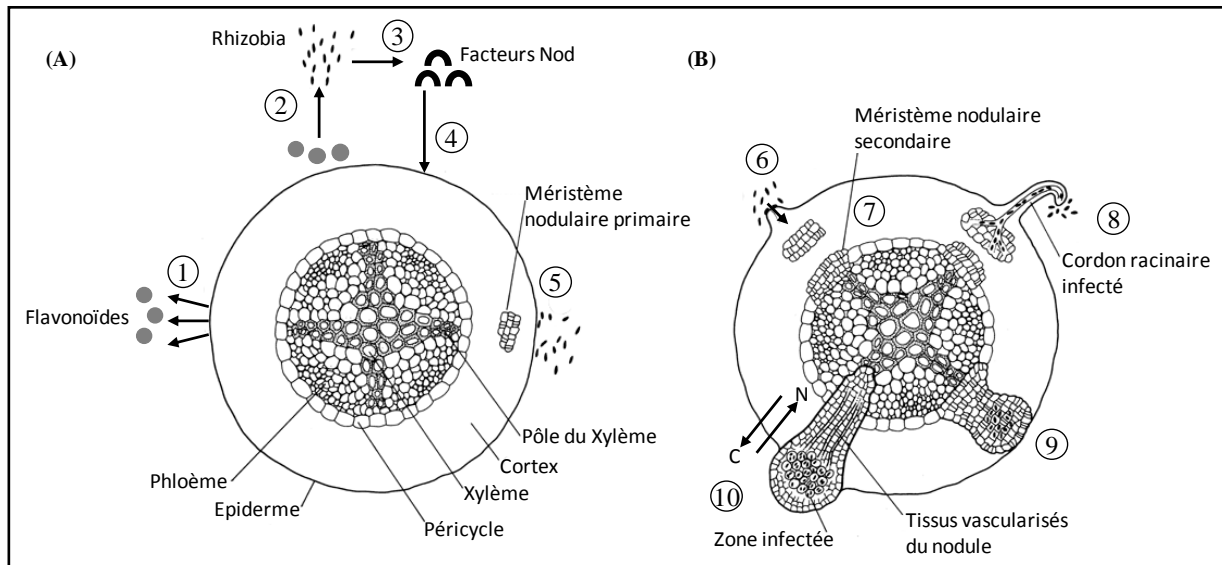


Figure 0.3 Les différentes étapes de l'initiation et du développement d'un nodule racinaire de légumineuse. (A) Les différentes phases impliquées dans l'initiation du nodule (attraction, reconnaissance, contact) sont: (1) l'excrétion de substances racinaires spécifiques, les flavonoïdes; (2) ces substances vont attirer les rhizobia; (3) la synthèse de facteurs Nod par les rhizobia va alors être stimulée; (4) les facteurs Nod induisent la division des cellules corticales; (5) les cellules du cortex se divisent pour former le méristème nodulaire primaire. (B) Les différentes phases impliquées dans l'infection et la formation du nodule (entrée, développement, différenciation) sont: (6) la fixation des bactéries sur la racine; (7) la division des cellules du péricycle à proximité du pôle du xylème; (8) la formation d'un cordon d'infection abritant les bactéries et la progression de la division au niveau des méristèmes nodulaires; (9) les deux types de méristèmes fusionnent pour former le nodule au sein duquel se situent les rhizobia; (10) le nodule se développe et certaines cellules se différencient pour former des connexions vasculaires permettant les échanges plante-rhizobia : la plante fournit du carbone à la bactérie et la bactérie permet un apport en azote à la plante. (D'après Taiz & Zeiger 2010).

La productivité végétale est donc plus importante dans le cas d'associations avec des mutualistes que se soient des bactéries (van der Heijden et al 2006a) ou des champignons (van der Heijden et al 2006b ; Vogelsang et al 2006). Parmi les symbiotes, les bactéries fixatrices d'azote sont responsables de 20 à 80 % de l'azote acquis par les légumineuses annuellement (Denison & Kiers 2004a ; Hobbie & Hobbie 2006). Les champignons mycorhiziens, quant à eux, permettent l'apport de 75 % du phosphore dont les plantes ont besoin annuellement (van der Heijden et al 2008). Les graminées ayant un métabolisme en C4 ne peuvent pas arriver à maturité dans leur sol natif sans l'association avec des champignons mycorhiziens qui leur apportent le phosphore nécessaire à leur développement (Wilson & Hartnett 1998). Cette stimulation indirecte de la croissance de la plante via un apport en nutriment peut aussi être plus directe, comme c'est le cas dans l'association symbiotique entre certaines graminées et la bactérie *Azospirillum* (Steenhoudt & Vanderleyden 2000). En effet, *Azospirillum* sécrète des hormones végétales induisant le développement des racines et donc la croissance du reste de la plante.

En conséquence de ces phénomènes, la composition des communautés végétales va être affectée. En effet, la compétition pour les nutriments est un facteur important dans la structuration d'une communauté végétale (Ryabov & Blasius 2011) ; or les symbiotes ont une influence sur l'acquisition de nutriments. Ils vont donc jouer sur l'aptitude compétitrice de la plante (Scheublin et al 2007 ; Wilson & Hartnett 1998) et modifier les interactions entre espèces. L'étude de Scheublin et al (2007) concernant les effets des AMF sur les interactions compétitives entre espèces végétales montre que les légumineuses et les graminées bénéficient toutes deux de l'association avec le champignon, quand elles poussent séparément. En revanche, une fois mises en compétition, les AMF favorisent les légumineuses et la biomasse des graminées est réduite de 38 %.

De plus, ces microorganismes qui vivent en symbiose avec la plante contribuent à la diversité des communautés végétales. Par exemple, van der Heijden et al (2006a) ont montré que la diversité des communautés végétales associées à des rhizobia était plus importante (+34 %) que pour celles ne bénéficiant pas de cette interaction. De même, van der Heijden et al (1998) constatent que les champignons mycorhiziens de type AMF augmentent la diversité végétale dans les pâturages en augmentant la capacité compétitrice des espèces avec lesquelles ils sont associés. Cependant, ces mêmes microorganismes peuvent, dans certains écosystèmes, favoriser l'établissement d'espèces dominantes qui seront plus compétitives, réduisant ainsi la diversité de la communauté (Hartnett & Wilson 1999 ; Rudgers & Clay 2008).

Il existe également des microorganismes symbiotiques qui ont des conséquences négatives sur la nutrition et la santé des plantes et qui se comportent comme des parasites vis-à-vis de la plante hôte. Il s'agit de champignons ou de bactéries qui, bien qu'ils utilisent les composés carbonés libérés par la plante, ne vont pas lui fournir de nutriments en retour (Burdon et al 2006) et/ou vont provoquer des maladies chez la plante hôte (Whipps 2001). Ils utilisent les mêmes signaux de reconnaissance et d'établissement vis-à-vis de la plante que les symbiotes mutualistes. *Agrobacterium tumefaciens* provoque ainsi des tumeurs sous forme de galles chez une grande variété de plantes dicotylédones en transférant des fragments d'ADN qui vont induire la tumeur. Ces fragments d'ADN sont introduits dans les cellules végétales et vont déclencher la surproduction d'hormones de croissance végétale (Brenic & Winans 2005). Cela provoque une prolifération des cellules permettant la formation d'une galle. Après l'établissement de la tumeur, les cellules transformées de la plante produisent et libèrent des acides aminés et des sucres qui permettent à la bactérie qui les colonise d'avoir une source de carbone et d'énergie.

Ils induisent alors un coût pour la plante (Morgan et al 2005) qui n'en tirera aucun bénéfice et vont donc réduire la productivité végétale.

Un parasite peut également contribuer à la composition des communautés à travers des mécanismes de feedback négatifs vis-à-vis de l'établissement des plantes sensibles au parasite (van der Putten 2003). De plus, beaucoup de parasites sont spécifiques de leur plante hôte, ce qui implique que ces plantes soient défavorisées face à l'arrivée d'une espèce végétale invasive qui ne sera pas sensible à ce microorganisme (Bever et al 2012).

Ces symbiotes parasites peuvent ainsi réduire la diversité végétale en favorisant une espèce particulière de plante ou à l'inverse permettre le maintien d'une certaine diversité en supprimant les espèces dominantes (Bever et al 1997).

1.2.3. Microorganismes non symbiotiques

Les photosynthétats qui ne sont pas utilisés par la plante ou par les symbiotes sont alors utilisés par les microorganismes du sol pour leur croissance. Ils vont les décomposer et les minéraliser. Les produits de cette minéralisation seront ainsi directement assimilables par la plante (Loreau 2000). Ces nutriments peuvent également être stockés dans la biomasse microbienne du sol. Les microorganismes vont de ce fait influencer leur répartition spatiale et temporelle. Par exemple, l'immobilisation de l'azote par les microbes telluriques va limiter les pertes de cet élément dans les eaux souterraines (Brooks et al 1998) et ainsi le maintenir à disposition pour la plante. De plus, dans les écosystèmes pauvres en azote, la biomasse microbienne accumule cet élément de façon importante en automne, au moment de la sénescence de la plante et le retient durant l'hiver et jusqu'au printemps où il sera alors disponible pour la plante (Bardgett et al 2005). Les microorganismes telluriques peuvent également avoir un rôle de protection contre les maladies (Eparvier et al 1991). Le rôle de protection passe le plus couramment par la production d'antibiotiques. *Pseudomonas fluorescens* et *P. putida* sont des bactéries capables de produire des antibiotiques permettant à la plante *Raphanus sativus*, le radis, de se défendre contre les *Fusarium*, des champignons pathogènes du sol (Brencic & Winans 2005). La protection assurée par les microorganismes non symbiotiques envers la plante peut également passer par des phénomènes de compétition entre ces microorganismes et les pathogènes. C'est le cas pour *P. fluorescens* qui permet la suppression des maladies par la compétition pour le fer. Le fer a une faible solubilité et par conséquent il est souvent en quantité limitée dans le sol et la rhizosphère. *Pseudomonas fluorescens* va sécréter des sidérophores (les pyoverdines) qui sont des composés ayant une forte affinité pour le fer et permettant à la bactérie de chélater le fer et de l'accumuler (Lemanceau 1992). Le fer n'est alors plus disponible pour les microorganismes pathogènes du sol qui en ont besoin pour leur croissance et leur activité. Certains microorganismes sont capables de produire des biosurfactants qui sont des composés pouvant endommager directement les membranes cellulaires de certains pathogènes et entraîner leur mort (Brencic & Winans 2005). En outre, des bactéries comme les *Pseudomonas* peuvent sécréter des enzymes (protéase, chitinase, lipase) capables de perturber la croissance de champignons pathogènes (Bolwerk et al 2003). Elles peuvent aussi produire des métabolites antifongiques qui vont limiter la maladie chez la plante (Bolwerk et al 2003).

Les microorganismes non symbiotiques mutualistes vont donc influencer positivement la croissance de la plante en jouant un rôle sur la disponibilité et la répartition des nutriments (van der Heijden et al 2008).

Certaines espèces microbiennes comme les bactéries *Pseudomonas* (Doornbos et al 2012) ou les champignons du genre *Trichoderma* (Harman et al 2004) sont des microorganismes libres, non symbiotiques à la base, mais qui ont aussi la capacité de s'associer avec une plante et de s'établir dans les racines. Ils vont alors s'assurer une source de nutriments et vont être bénéfiques pour la plante hôte. Les bactéries qui sont mutualistes vis-à-vis de la plante, qu'elles soient symbiotiques ou non, sont appelées bactéries PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria), ou Rhizobactéries promouvant la croissance de la plante. Elles ont des effets bénéfiques sur le développement et la croissance végétale, le contrôle des pathogènes et la dégradation des composés toxiques pour la plante (Bakker et al 2007).

Cependant, certains microorganismes non-symbiotiques peuvent avoir un effet négatif sur la plante quand ils sont impliqués dans des phénomènes de compétition avec la plante ou quand ils sont responsables de la perte de nutriments. Par exemple, en cas de carence en azote, les microorganismes qui utilisent également une partie de l'azote minéral vont être en compétition avec la plante pour cet élément (Dunn et al 2006). Enfin, le processus de dénitrification, effectué par les bactéries dénitrifiantes et par quelques espèces de champignons, peut entraîner la perte de l'azote sous une forme gazeuse (Girard et al 2005). Par exemple, dans les écosystèmes forestiers tropicaux, la perte d'azote minéral du sol par le processus de dénitrification peut représenter jusqu'à 50 % du pool d'azote (Houlton et al 2006).

La croissance de la plante va alors être négativement affectée par ce type de microorganismes de par le manque de nutriments. La productivité végétale peut aussi être affectée directement par certains pathogènes entraînant la mort de la plante. C'est le cas par exemple des bactéries *Erwinia* qui libèrent des enzymes provoquant une dépolymérisation des parois cellulaires végétales et donc le pourrissement de la plante (Brencic & Winans 2005).

Qu'ils soient mutualistes ou parasites, les microorganismes non symbiotiques peuvent influencer la diversité et la composition des communautés végétales, en influençant le potentiel adaptatif des plantes au milieu abiotique (apport en nutriments) ou biotique (compétition intra-règne et meilleure tolérance/résistance à des organismes pathogènes) (Wardle et al 2004).

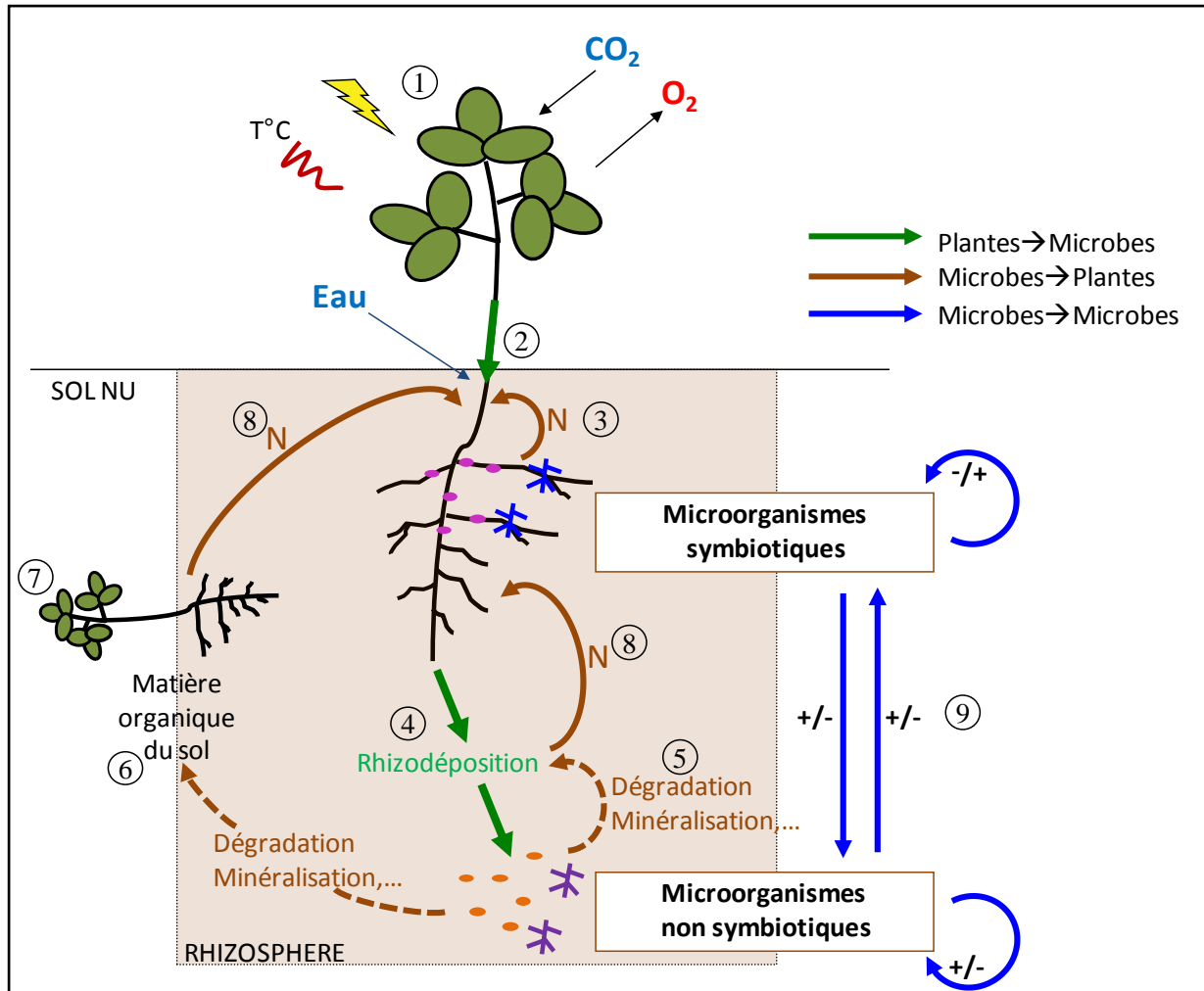


Figure 0.4 Représentation schématique des interactions mutualistes entre la plante (autotrophe) et les microorganismes (hétérotrophes) et entre les microorganismes eux-mêmes au sein de la rhizosphère. (1) La plante réalise la photosynthèse grâce à l'énergie lumineuse, le CO₂, l'eau et les nutriments ; la température est également un facteur important dans ce processus. (2) Une partie des photosynthétats produits par la plante suite à la photosynthèse va être fourni aux microorganismes symbiotiques qui (3) en échange vont fournir des nutriments (N) à la plante. (4) Le reste des photosynthétats sera libéré dans le sol, via la rhizodéposition, et disponible pour la croissance des microorganismes non symbiotiques. Ces derniers vont, en retour, dégrader la matière organique présente (5) dans la rhizosphère ou (6) dans le sol nu, ainsi que (7) la matière végétale à la mort de la plante afin de (8) fournir des nutriments à la plante. (9) Il existe aussi des interactions entre les microorganismes eux-mêmes qui peuvent intervenir dans les interactions plante-microbes.

1.3. La biodiversité microbienne

1.3.1. Interactions entre microorganismes et effets sur la plante

Les microorganismes ne sont pas isolés dans le sol et sont structurés en communautés complexes au sein desquelles diverses interactions microbiennes existent (Whipps 2001) (Figure 0.4). En effet, certains effets positifs sur la plante sont dus, comme il a été discuté précédemment, à des phénomènes de compétition entre les microorganismes non symbiotiques eux-mêmes. Une trop forte diversité de mutualistes non symbiotiques peut néanmoins s'avérer négative pour la plante. Becker et al (2012) montrent que différentes souches mutualistes de *Pseudomonas*, ayant chacune un rôle de protection contre les pathogènes de la plante, vont s'inhiber mutuellement quand elles seront inoculées ensemble. En effet, les toxines qu'elles produisent envers les pathogènes de la plante augmentent leur compétitivité dans la rhizosphère quand elles sont seules ; cependant, inoculées ensemble la trop forte quantité de toxine devient négative pour l'ensemble de la communauté microbienne. Dans ces conditions, Becker et al (2012) observent une perte de 98 % de la densité bactérienne et une perte complète du rôle protecteur des *Pseudomonas*.

Les symbiotes sont également soumis à des interactions. L'étude d'Albrechtova et al (2012) met en évidence une biomasse trois fois plus importante et une capacité anti-oxydante quatre fois plus élevée chez une espèce d'oignons, *Allium cepa*, quand elle est soumise à une inoculation avec un mélange de six espèces d'AMF du genre *Glomus* par rapport à l'inoculation avec une seule de ces six espèces. De même, Khan et al (2008) montrent dans leur étude qu'une inoculation avec deux souches mutualistes de *Glomus* conduit à une augmentation de la biomasse totale de la légumineuse *Medicago sativa* et à une teneur plus importante en azote, phosphore et potassium en comparaison à l'inoculation avec ces deux souches séparément.

Il est intéressant de noter qu'il existe aussi des interactions entre les microorganismes symbiotiques et non symbiotiques. En effet, dans certains cas les microorganismes non symbiotiques vont faciliter l'implantation des microorganismes symbiotiques au niveau de la plante hôte. L'étude de Pivato et al (2009) met en évidence une meilleure colonisation mycorhizienne à l'intérieur des racines de la légumineuse *Medicago truncatula* en présence de la bactérie non symbiotique *Pseudomonas fluorescens*. Albrechtova et al (2012) montrent que la double inoculation d'un AMF et d'un champignon décomposeur va permettre un meilleur rendement et une meilleure qualité nutritionnelle chez *Allium cepa*, en présence d'un apport en matière organique. En effet, l'activité de décomposition du champignon

décomposeur va être stimulée par la matière organique apportée. Ce phénomène va contribuer à un recyclage plus important de la matière organique en éléments minéraux disponibles pour la plante. La plante va alors augmenter sa biomasse et ses interactions avec le champignon qui va croître et lui apporter en échange le phosphore dont elle a besoin pour sa croissance. L'inverse est également vrai puisque les AMF sont capables d'influencer la décomposition de la matière organique à travers leur interaction avec des microorganismes non symbiotiques du sol (Csimas et al 2012 ; Leigh et al 2011). Ils constituent également une niche particulière dans laquelle vont s'implanter certaines bactéries. Le réseau d'hyphes que développent ces champignons dans le sol va permettre l'implantation de bactéries PGPR mutualistes de la plante et leur propagation dans toute la rhizosphère (Bianciotto & Bonfante 2002).

Il peut se produire parfois des transferts de gènes entre espèces microbiennes. Ainsi des microorganismes libres peuvent mettre en place des interactions symbiotiques ou générer de nouvelles fonctions de virulence ou de mutualisme (Beattie & Lindow 1999 ; Brenner & Winans 2005). C'est le cas des gènes de fixation de l'azote chez le symbiote *Sinorhizobium meliloti* qui sont sur des plasmides mobiles (Boivin et al 1990 ; Farrand et al 2003), de même que le gène codant pour les effecteurs qui déterminent la spécificité d'hôte chez le pathogène *Pseudomonas syringae* (Bender et al 1999). Les communautés microbiennes interagissent et évoluent regroupant de ce fait une grande diversité de microorganismes réalisant diverses fonctions.

1.3.2. Richesse spécifique vs fonctionnelle

La diversité de fonctions assurées par les microorganismes vis-à-vis de la plante montre que le sol est un milieu vivant. Les diverses interactions biotiques et abiotiques ayant lieu au sein de la rhizosphère en font un milieu complexe et structuré. On estime qu'il y a, pour un gramme de sol, entre 10^{10} et 10^{11} bactéries (Horner-Devine et al 2003) regroupées en 6000 à 50 000 espèces (Curtis et al 2002) et jusqu'à 200 m d'hyphes fongiques (Leake et al 2004). Or cette forte richesse spécifique ne reflète pas exactement la richesse fonctionnelle du sol (Flynn et al 2009 ; Gamfeldt et al 2008). Des études de survie microbienne estiment que 80 % des cellules bactériennes du sol sont en dormance car les conditions externes ne leur sont pas favorables (Bever et al 2012). Elles n'assurent donc aucune fonction vis-à-vis de la plante. De plus, les communautés microbiennes du sol se caractérisent par une redondance fonctionnelle (Schmera et al 2012) (Figure 0.5). Plusieurs microorganismes telluriques assurent des fonctions identiques, généralement, quand les fonctions assurées ont une importance fondamentale au sein de la rhizosphère. La fonction de décomposition de la matière organique

qui est une fonction essentielle pour la croissance des végétaux et donc la productivité primaire de nos écosystèmes devrait donc être assurée par un très grand nombre de microorganismes. En effet, Wertz et al (2006) ont montré dans leur étude qu'une perte de plus de 90 % de la diversité bactérienne n'affecte pas la fonction de minéralisation de la matière organique, ni les fonctions de nitrification et dénitrification permettant le recyclage de l'azote au sein de la rhizosphère. Cependant des fonctions microbiennes rares sont aussi importantes. Gera Hol et al (2010) montrent dans leur étude que des espèces rares au sein de la communauté microbienne de plantes cultivées sont indispensables pour leur rôle de protection contre les maladies, et, que le fait de perdre ces espèces rares entraîne une baisse de productivité végétale. Ainsi des espèces minoritaires peuvent aussi assurer des fonctions secondaires mais néanmoins importantes. De plus, comme il a été discuté précédemment, c'est parfois l'association de plusieurs fonctions microbiennes qui contribue à un effet positif sur la productivité végétale.

1.3.3. Assurance écologique

Le caractère redondant des fonctions essentielles assurées par les microorganismes du sol permet d'assurer une stabilité au fonctionnement de la communauté microbienne (Nannipieri et al 2003). Autrement dit, une communauté microbienne qui subira un stress dû à une perturbation biotique ou abiotique continuera à assurer ses fonctions pour la plante au sein de la rhizosphère. Gamfeldt et al (2008) mettent en évidence ce phénomène de façon théorique. Quand la redondance fonctionnelle est importante, une érosion de la diversité spécifique ne perturbe pas immédiatement les fonctions assurées par la communauté microbienne. En effet, du fait de la redondance des fonctions assurées par les espèces microbiennes perdues, l'érosion de diversité conduit à un seuil de stagnation des fonctions microbiennes. Cependant si trop d'espèces sont perdues, ce seuil est dépassé et la perte d'espèce entraînera alors une perte progressive de certaines fonctions. Avant ce seuil, quand la richesse spécifique ne dépend pas de la richesse fonctionnelle, on parle de stabilité de la communauté microbienne (Figure 0.5). Cela va donc permettre une stabilité de fonctionnement face à diverses perturbations. La stabilité d'une communauté inclut deux autres concepts qui sont la résilience et la résistance (Allison & Martiny 2008). La résilience est la capacité à retrouver son état initial suite à une perturbation et la résistance est la capacité à résister à une perturbation. D'après Peh & Lewis (2012), le fait d'avoir subi une perturbation n'affecterait pas la résistance d'une communauté. En effet, pour Peh et Lewis (2012), les espèces qui survivent à une extinction ont par définition une meilleure résistance au stress. Une

communauté microbienne ayant une forte diversité va donc permettre une plus grande stabilité de la communauté face aux perturbations. C'est le cas par exemple dans l'étude de van Elsas et al (2012) qui montre qu'une forte diversité permet à la communauté microbienne une meilleure résistance contre des bactéries pathogènes. En effet, pour une telle communauté, l'ensemble de la niche rhizosphérique est remplie et les ressources du milieu sont utilisées par les microorganismes indigènes entraînant une forte compétition pour la bactérie invasive et empêchant ainsi l'établissement de cette bactérie pathogène. De la même façon, Griffiths et al (2000) mettent en évidence une perte de résilience dans une communauté où la diversité est réduite quand un stress est imposé de façon continue. Cela peut s'expliquer par le fait que quand une communauté microbienne subit une perturbation ce sont d'abord les espèces rares, qui sont les moins compétitives, et dont les fonctions assurées sont peu ou pas redondantes, qui sont en général amenées à disparaître. Peh & Lewis (2012) montrent que les espèces rares ont un rôle dans le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes à long terme. Ainsi, d'après Wertz et al (2007) il faudrait s'intéresser au niveau de diversité dans chacun des groupes fonctionnels.

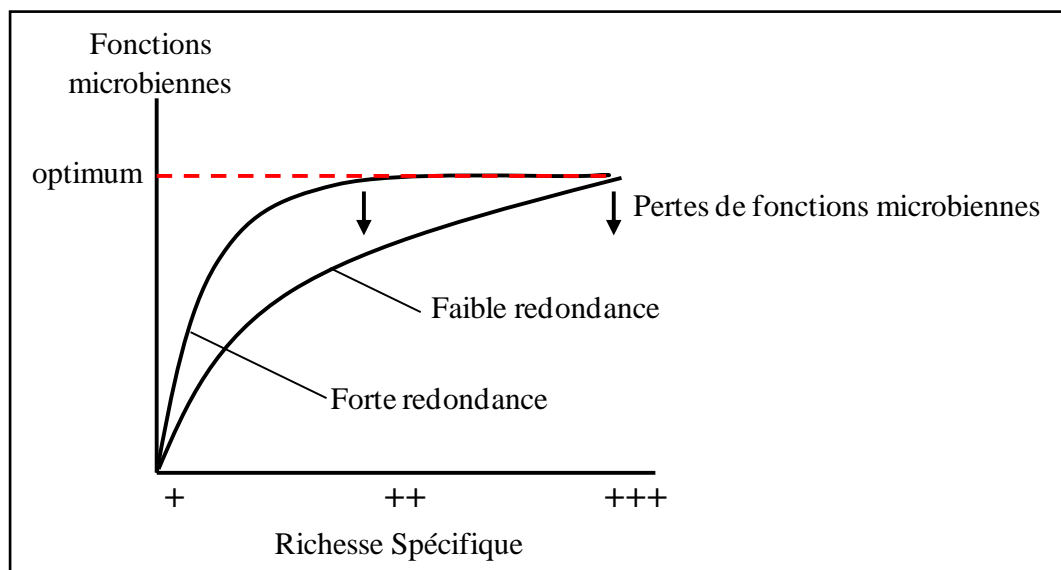


Figure 0.5 La redondance fonctionnelle microbienne (D'après Gamfeldt et al 2008). Une forte redondance fonctionnelle permet à une communauté microbienne de maintenir l'ensemble de ses fonctions à un niveau optimal même quand la richesse spécifique diminue, ce qui confère une stabilité à cette communauté. En revanche, pour une faible redondance fonctionnelle, l'érosion de la richesse spécifique entraîne rapidement une perte des fonctions microbiennes néfaste au fonctionnement de la communauté microbienne.

2. Des services écosystémiques remis en cause par les changements globaux

2.1. Intérêt écologique des compartiments végétal et microbien

L'intérêt d'étudier les compartiments végétal et microbien est justifié par le rôle fondamental de ces deux compartiments et de leur interaction dans le fonctionnement des écosystèmes. Or, ce bon fonctionnement contribue au bien-être humain et doit être pris en compte pour une gestion durable de nos écosystèmes.

Un grand nombre de services écosystémiques sont fournis par les végétaux. On peut les regrouper en trois groupes : les services (1) d'approvisionnement, (2) de régulation et (3) les services culturels (MEA 2005a) (Figure 0.6).

(1) Les plantes sont d'abord des producteurs primaires essentiels à l'alimentation humaine et animale. La préoccupation alimentaire est un enjeu de société majeur puisqu'il faut nourrir l'ensemble de la population mondiale soit sept milliards d'habitants. La productivité végétale en terme de croissance, c'est-à-dire la production de parties végétatives produites au cours de la croissance de la plante, est importante puisque c'est ce qui est principalement utilisé dans l'alimentation humaine et animale ainsi que l'alimentation de beaucoup d'autres espèces *in natura*. La production de graines est aussi un paramètre important pour que l'espèce végétale perdure mais également pour son rôle dans l'alimentation. La composition des communautés végétales est aussi prise en compte pour se concentrer sur les espèces utiles pour l'alimentation. En effet, certaines espèces comme les espèces invasives ou les adventices sont nuisibles aux autres plantes de la communauté (Harker et al 2001). La diversité spécifique permet une meilleure productivité végétale des écosystèmes (Cardinale et al 2004). Une communauté diversifiée est donc une des caractéristiques nécessaires pour le maintien des services écosystémiques par rapport à la productivité végétale. En plus de leur implication dans l'alimentation, les végétaux sont la principale source d'approvisionnement en fibres végétales (tissu, papier,...), en bois et en énergie. A propos de l'énergie, on peut citer, par exemple, les biocarburants qui sont un domaine d'étude en pleine expansion (Liang et al 2012) et qui nécessite une productivité conséquente (Yacobucci & Schnepf 2007). Enfin, en matière d'approvisionnement, les végétaux permettent la découverte de molécules qui entrent dans la composition de nombreux médicaments et jouent donc un rôle fondamental dans la santé humaine. Dans ce domaine, la productivité, la composition et la diversité végétale sont des paramètres nécessaires pour la production en quantité suffisante de toutes les essences végétales utilisées. Enfin, certains services provenant des végétaux ne sont pas directement visibles mais leur importance n'en

est pas moindre. Il s'agit du rôle des végétaux comme niche fondamentale et comme ressources (pollinisation) pour de nombreux organismes (arthropodes, nématodes,...) qui vont contribuer à la diversité biologique au sens large, essentiel au fonctionnement des écosystèmes (Borer et al 2012).

(2) Les plantes assurent aussi les services de régulation. La végétation constitue, après les océans, le deuxième puits de carbone de l'écosystème. On estime à environ 120×10^{15} g C an^{-1} la quantité de carbone globale qui passe de l'atmosphère à la biosphère via le processus de photosynthèse (Grace & Zhang 2006). Parmi cette quantité, 62×10^{15} g C an^{-1} sont dévolus à la productivité primaire nette (NPP), c'est-à-dire qu'ils restent stockés dans la biosphère sous forme de carbone organique (Grace & Zhang 2006). La composition des communautés n'est pas négligeable puisque toutes les espèces végétales ne contribuent pas de la même façon au stockage du carbone. Les forêts tropicales et les prairies sont responsables d'un tiers de ce processus de NPP (Grace & Zhang 2006 ; Post & Kwon 2000). Le reste du carbone transformé via la photosynthèse est libéré dans l'atmosphère par les processus de respiration et photorespiration. Ainsi les végétaux sont fortement impliqués dans le cycle du carbone qui contribue au fonctionnement de nos écosystèmes en intervenant notamment dans la régulation du climat. Les végétaux, de par leur besoin en eau et leur processus de transpiration, vont intervenir dans le cycle de l'eau. En effet, pour assurer leur croissance, les plantes ont besoin d'eau car cela leur permet un apport en nutriments sous forme dissoute (Zhou et al 2007). Cette prise d'eau est compensée par des pertes dues à la transpiration de la plante suite à la photosynthèse, ce qui entraîne la circulation de la sève dans la plante (Jarvis & McNaughton 1986). Les plantes perdent environ 100 fois plus de vapeur d'eau par leurs stomates qu'elles ne captent de CO_2 (Woodward 2008). Enfin, les plantes entrent en jeu dans le cycle des autres nutriments qu'elles utilisent (N, P, K, ...) (Chapin 1990) et cela peut varier en fonction de la diversité de la communauté végétale. Par exemple, concernant l'azote qui est, après le carbone, le deuxième élément limitant pour la photosynthèse (Luo et al 2004), les communautés végétales de prairies diversifiées vont capter en moyenne $21 \text{ g N m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ alors que des monocultures capteront $13 \text{ g N m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ (Bessler et al 2012).

(3) Concernant l'apport culturel fourni par les végétaux, on peut citer leur rôle économique (écotourisme, valeur esthétique) ou encore leur rôle historique, spirituel et religieux (FRB 2012 ; MEA 2005a).

Concernant le compartiment microbien on peut distinguer (1) des services de régulation et (2) d'approvisionnement (Figure 0.6).

(1) Les microorganismes interviennent dans la formation des sols et l'établissement des espèces végétales (Knelman et al 2012 ; Mapelli et al 2011). Les cyanobactéries, par exemple, sont capables de réaliser la photosynthèse et de produire des molécules organiques qui serviront de substrat aux autres bactéries hétérotrophes leur permettant ainsi de coloniser un milieu vierge (Subashchandrabose et al 2011). De même, le réseau dense d'hyphes des AMF va avoir des effets d'agrégation des particules du sol. Ceci permet une protection physique du carbone labile (carbone fournit par la plante) du sol et joue ainsi un rôle important dans la séquestration du carbone (Six et al 2006). Ils interviennent aussi dans les grands cycles biogéochimiques qui régulent le fonctionnement de nos écosystèmes (C, N, nutriments, eau ...). Les microorganismes sont impliqués dans les processus de décomposition, minéralisation et immobilisation de la matière organique du sol ce qui permet le recyclage du carbone (Yuan et al 2012). Le sol stocke 80 % du carbone total de l'écosystème (Nielsen et al 2011). Le cycle de l'azote est également dépendant des microorganismes qui interviennent à chaque niveau de transformation de cet élément notamment dans les étapes de nitrification et dénitrification (Philippot et al 2007 ; Rosswall 1976 ; Veresoglou et al 2012).

(2) Les microorganismes interviennent dans la qualité de l'eau et du sol. Ils jouent un rôle dans la qualité des sols de par leur capacité à éliminer les éléments toxiques (Bakker et al 2007 ; Brussaard et al 2007 ; Kuiper et al 2004 ; Morgan et al 2005). Comme le montre l'étude de Subashchandrabose et al (2011), les microorganismes tels que les cyanobactéries sont capables de transformer ou dégrader les polluants organiques ou les métaux lourds. Il en est de même pour la qualité de l'eau avec le traitement des eaux usées au moyen de microorganismes (Chavan & Mukherji 2008 ; Gutzeit et al 2005 ; Subashchandrabose et al 2011). Dans ce rôle de dépollution la densité microbienne est importante car l'effet peut parfois être densité-dépendant (Denison & Kiers 2004b) mais leur diversité est aussi importante vis-à-vis des diverses fonctions qu'ils doivent assurer (Finlay et al 1997). Ils permettent ainsi des avancées dans le domaine des biotechnologies en rendant possible, par exemple, la production commerciale de métabolites microbiens destinés à la purification des milieux contaminés (Subashchandrabose et al 2011). Enfin, les microorganismes entrent dans la composition des vaccins et permettent la production d'antibiotiques utilisés à des fins médicales, ce qui confère un intérêt non négligeable à leur étude (Hueck 1998).

2.2. Services écosystémiques émergeant de l'interaction plantes-microbes

Le fonctionnement des compartiments végétal et microbien étant fortement lié, alors l'étude des plantes implique celle des microorganismes. Ainsi, les services imputés à chaque partenaire résultent souvent de l'interaction entre les deux (Figure 0.6). En effet, les services écosystémiques fournis par les plantes sont indirectement dus aux microorganismes car ils interviennent dans l'établissement même des communautés végétales et régulent la productivité, la composition et la diversité des communautés végétales ainsi que leur qualité nutritionnelle. La diversité microbienne est donc importante (Gamfeldt et al 2008 ; Loreau 2001a ; Loreau et al 2001b) de même que la diversité végétale (Finlay et al 1997 ; Kihara et al 2012 ; Zak et al 2003). En effet, la diversité spécifique permet une stabilité des communautés concernées et par conséquent la productivité tend à être plus importante.

Tous les cycles biogéochimiques font intervenir les composantes végétales et microbiennes et les services découlant de ces cycles biogéochimiques ne pourraient pas être rendus sans l'intervention des deux partenaires. Ainsi, la captation de l'azote atmosphérique par les plantes est rendue possible grâce à l'association de ces plantes avec des bactéries spécifiques et permet un enrichissement des sols en azote, sans nécessiter l'ajout d'engrais azotés. De même, les AMF sont capables de réduire jusqu'à 40 fois les pertes d'azote via le lessivage des sols par l'eau de pluie (Asghari & Cavagnaro 2012) et le gardent ainsi disponible pour les plantes ne nécessitant pas d'ajout exogène de cet élément dans les sols agricoles.

Le cycle des nutriments au sein de la biosphère fait aussi intervenir les plantes et les communautés microbiennes. En effet, les plantes libèrent des composés organiques dans le sol ce qui représente un pool de nutriments qui ne pourra être recyclé que par l'activité de décomposition des microorganismes (Raynaud et al 2006).

Les microorganismes apportent d'autres services par l'intermédiaire des plantes dans le domaine de l'agriculture ; on peut parler de services agroécosystémiques (Cortois & De Deyn 2012 ; Wu et al 2009). La phytoprotection, c'est-à-dire la capacité des microorganismes à protéger la plante contre les pathogènes, est un service agroécosystémique important car il permet de s'affranchir des traitements chimiques (Kuiper et al 2004). De plus, la biodiversité microbienne permet une agriculture durable grâce au recyclage des nutriments auquel participent les microbes telluriques (Brussaard et al 2007). On utilise ainsi des inoculums microbiens dans les agroécosystèmes comme, par exemple, l'inoculation des mycorhizes dans les cultures pour une meilleure productivité (Verbruggen et al 2012).

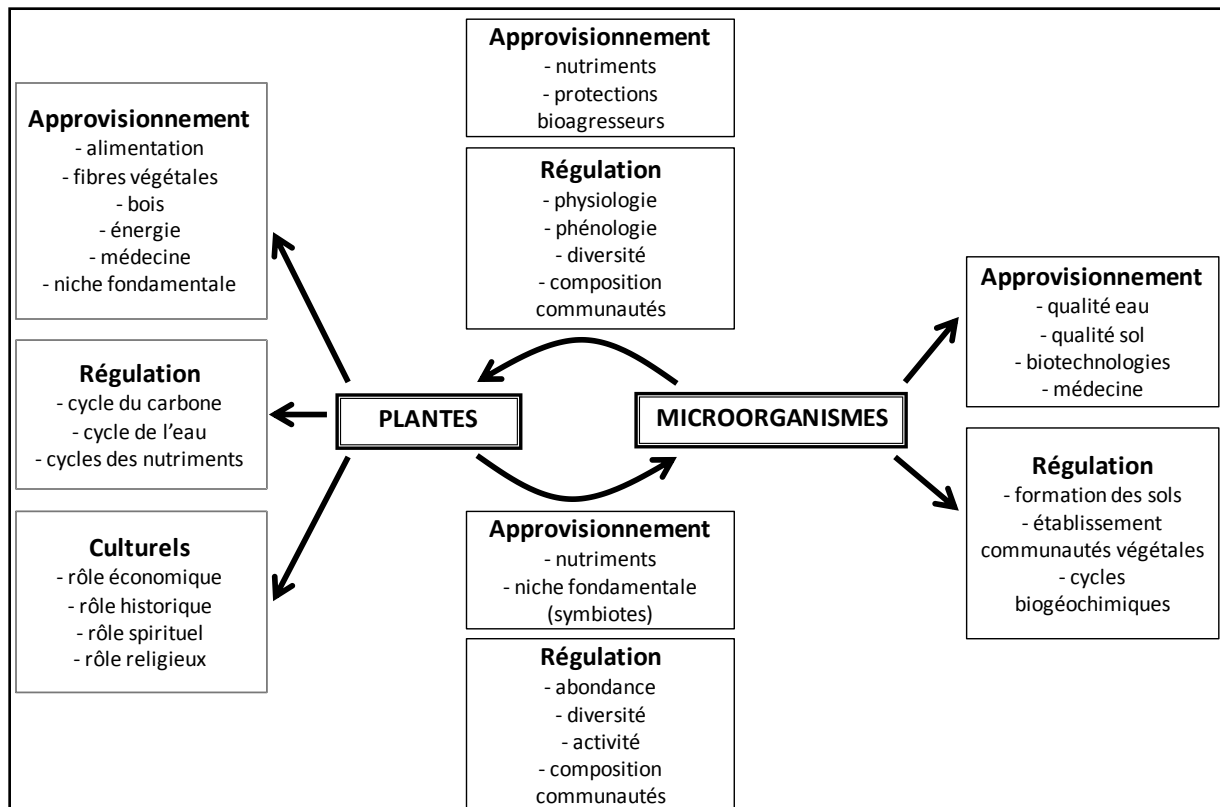


Figure 0.6 Services écosystémiques rendus par les plantes, les microorganismes telluriques et leurs interactions. Les plantes fournissent des services écosystémiques d'approvisionnement, de régulation et des services culturels et les microorganismes fournissent des services d'approvisionnement et de régulation. Cependant, les services rendus par ces deux compartiments dépendent des services d'approvisionnement et de régulation qui existent entre les plantes et les microorganismes et qui contribuent à la force de leurs interactions.

2.3. Les changements globaux

Depuis les années 1950, on observe des modifications majeures au niveau de nos écosystèmes, que l'on attribue à des modifications climatiques désignées sous le terme de changements globaux. Ces modifications peuvent avoir des causes naturelles, comme les éruptions volcaniques, l'activité solaire (IPCC 2001) ou les modifications des courants marins,... (Duplessy 2001). Tous ces facteurs contribuent à une oscillation des températures, qui aboutit globalement à un réchauffement de la surface terrestre (Bertrand 2004 ; Duplessy 2001 ; IPCC 2001). Cependant, les modèles simulant les variations de température et prenant en compte ces seules causes naturelles ne suffisent pas à expliquer la hausse actuelle des températures (Bertrand 2004 ; Duplessy 2001 ; Hegerl et al 2003 ; IPCC 2007). C'est, en effet, lors de la Révolution Industrielle de 1950 que l'on observe une forte augmentation des gaz à effet de serre (GES) corrélée à une augmentation des températures (IPCC 2001). Ces changements sont donc en grande partie dus aux activités humaines et leurs conséquences sont déjà visibles (Bertrand 2004 ; Duplessy 2001 ; IPCC 2007 ; Nelson 2005b ; Parmesan 2006 ; Vitousek 1994 ; Vitousek et al 1997a).

Parmi les GES, le CO₂ est celui qui pose le plus de problèmes étant donné sa concentration importante dans l'atmosphère. Celle-ci correspond actuellement à une concentration de 365 parties par million (ppm), soit une augmentation de 85 ppm par rapport au taux de référence de 280 ppm enregistré en 1950 alors stable depuis 420 000 ans (IPCC 2001). Cette concentration continue d'augmenter et devrait atteindre 540 à 970 ppm d'ici 2100 suivant les modèles prédictifs utilisés (IPCC 2001). Cependant, d'autres GES (Oxyde nitreux -N₂O, méthane -CH₄, ...) sont préoccupants car, bien qu'on ne les trouve qu'en faible quantité, leur durée de persistance dans l'atmosphère est bien plus importante que celle du CO₂ (IPCC 2007).

Ces modifications de la composition atmosphérique s'accompagnent de perturbations climatiques, principalement une hausse des températures due à l'effet de serre. Durant les 100 dernières années, la température moyenne de la surface terrestre a augmenté d'environ 0,6 °C et des hausses de l'ordre de 1,4 à 5,8 °C sont prévues d'ici 2100 selon les modèles prédictifs employés (IPCC 2001 ; Jones et al 1999).

Le cycle de l'eau est également affecté. Il est ainsi prévu au cours du 21^{ème} siècle une augmentation des épisodes pluvieux (Bertrand 2004 ; IPCC 2001 ; Nelson 2005a,b) et davantage d'évènements climatiques extrêmes, comme des phénomènes de sécheresse et d'inondation (Nelson 2005b). Ces phénomènes devraient augmenter autant en fréquence qu'en intensité.

Parmi les causes anthropiques, la combustion des combustibles fossiles est largement responsable de l'émission de GES. Cependant, la cause prédominante est le changement d'utilisation des terres (IPCC 2007 ; Vitousek et al 1997a) en réponse aux besoins croissants de la population mondiale. En effet, l'accroissement démographique mondial est la principale cause à l'origine de la part anthropique du réchauffement global (Nelson 2005b ; Tilman et al 2001b). Les besoins croissants de la population conduisent à des modifications de notre gestion des écosystèmes, notamment un changement dans les pratiques culturales qui correspondent aux principes de la Révolution Verte (Tilman et al 2001b). Il s'agit d'une intensification de l'agriculture, destinée à augmenter les rendements et qui s'accompagne d'un changement d'utilisation des terres (Tilman et al 2002 ; Vitousek et al 1997a).

Parmi ces changements d'utilisation des terres, les apports intensifs de fertilisants et de pesticides posent des problèmes d'eutrophisation et de pollution des sols (Carpenter et al 1998 ; Cassman 1999 ; Nelson 2005b ; Tilman et al 2001a, 2002). La production d'engrais azotés a été le principal moteur de la remarquable augmentation de la production alimentaire qui a eu lieu au cours des 50 dernières années (Tilman et al 2001a, 2002). L'application d'azote a ainsi quintuplé depuis 1960 (Nelson 2005b). Le MEA (2005b) estime à 85 millions de tonnes la quantité d'azote apportée dans les sols sous forme de fertilisants pour l'année 2000. Or ces intrants, essentiels au maintien du niveau de production actuel (Tilman et al 2002), perturbent les cycles biogéochimiques régulés par les microorganismes du sol. Actuellement, seulement 30 à 50 % de l'apport en fertilisant azoté sont assimilés par les cultures et 45 % de l'apport en phosphore ; le reste est majoritairement perdu par le lessivage, qui entraîne ces éléments dans d'autres compartiments de l'écosystème (Tilman et al 2002). Cela provoque des phénomènes d'eutrophisation, de perte de biodiversité (Altieri 2005) ou de dominance d'espèces envahissantes (Vitousek et al 1997a). De même, l'utilisation intensive de pesticides pose les mêmes problèmes de pollution des écosystèmes et d'érosion de la biodiversité. En effet, 10 % à 35 % des pesticides appliqués localement sont perdus dans le sol et 50 % à 75 % des pesticides appliqués par pulvérisation sur les cultures manquent leur cible et sont dispersés dans l'écosystème (Altieri 2005 ; Carpenter et al 1998). Ainsi depuis 1960, le flux d'azote réactif (biologiquement disponible) présent dans les écosystèmes terrestres a doublé et le flux de phosphore a triplé (Altieri 2005). Il faut aussi noter que la production de ces intrants nécessite de l'énergie fossile ce qui produit des GES ; de même que le transport de ces intrants jusqu'au lieu d'application. Un autre problème dans l'utilisation des sols agricoles est qu'ils sont souvent soumis à des pratiques intensives qui ont pour conséquence d'appauvrir les sols (Koellner & Scholz 2008) ; de même pour les systèmes de

monoculture, qui peuvent aussi rendre le sol plus sensible aux espèces adventices et aux pathogènes (Bever et al 2012).

Le Millenium Ecosystem Assessment (MEA 2005a,b) estime qu'actuellement, toutes les terres favorables à la production alimentaire sont cultivées. Il n'y aurait plus d'espaces nouvellement disponibles pour l'agriculture. Entre 1950 et 1980 (soit 30 ans), un plus grand nombre de terres a été converti en agroécosystèmes que durant les 150 ans séparant 1700 et 1850. Les systèmes cultivés couvriraient actuellement un quart de la surface terrestre (MEA 2005a,b). Les nouvelles terres agricoles se forment donc au détriment d'écosystèmes naturels. Ainsi, les problèmes de déforestation et de fragmentation des habitats sont prédominants (Achard et al 2002 ; MEA 2005a,b) et engendrent principalement l'érosion de la biodiversité (Vitousek et al 1997a). La déforestation contribue notamment à augmenter l'énergie solaire réfléchiée par la surface terrestre ce qui renforce le réchauffement climatique (Chapin et al 2008). Ces problèmes face aux agroécosystèmes se posent aujourd'hui et continueront à prendre de l'importance en raison des besoins croissants de la population (Vitousek et al 1997a).

Un des autres problèmes majeurs qui se pose en agriculture est le problème de l'eau. Les prélèvements d'eau dans les rivières et les lacs ont doublé depuis 1960. Le MEA estime que 70 % de l'eau utilisée dans le monde est destinée à l'agriculture (MEA 2005a,b). La conséquence des changements climatiques sur les précipitations (intensité, période de sécheresse plus importante,...) et leurs conséquences auront donc des effets importants sur la conduite des agroécosystèmes.

Pour finir, un des volets des changements globaux, qui peut aussi être considéré comme une conséquence, est l'apparition d'espèces invasives. L'aire de répartition d'une espèce est en grande partie déterminée par des facteurs environnementaux (Holt 2003), en particulier par la tolérance de ces espèces à la température ou aux précipitations (Battisti et al 2005). Or les espèces végétales sont limitées dans leurs déplacements ; les populations vont alors connaître des événements d'extinction ou de colonisation (Walther et al 2002). Certaines espèces vont voir leur niche fondamentale (celle qui réunit les conditions environnementales nécessaires à leur croissance) s'étendre et elles vont pouvoir coloniser des zones géographiques autres que leur zone d'origine. Ces déplacements sont soit naturels soit d'origine anthropique. Quand elles réussissent à s'implanter dans une nouvelle zone et deviennent plus compétitives que les espèces locales, on parle d'espèces invasives.

3. Conséquences des changements globaux sur l'association plantes-microbes

3.1. Effets sur les plantes

Les quatre facteurs abiotiques nécessaires à la croissance d'une plante (lumière, CO₂, nutriments, eau) ainsi que la température essentielle à son développement sont affectés par les changements globaux. De plus, ces facteurs abiotiques sont en partie régulés par les microorganismes du sol qui seront eux-mêmes affectés par ces changements. Dans ces conditions, on peut s'attendre à un fort impact des changements globaux sur les plantes (Figure 0.7).

3.1.1. Hausse de la concentration en CO₂

Les plantes sont les premiers organismes qui intègrent le carbone dans l'écosystème terrestre (Drigo et al 2008). Elles utilisent l'énergie lumineuse pour assimiler cet élément et réaliser la photosynthèse. Une étude synthétique réalisée avec différents couverts végétaux (forêts, prairies, marais, espaces cultivés et déserts) montre qu'en moyenne le taux de fixation photosynthétique du carbone augmente de 30 à 70 % quand la concentration en CO₂ atmosphérique augmente de 200 à 350 ppm (Luo et al 2006). Cette augmentation du taux de photosynthèse va se produire dans la majorité des cas et en particulier pour les plantes ayant un métabolisme C3 (Luo et al 1998). En effet, pour ce type de plante, le processus coûteux de respiration de la partie aérienne (la photorespiration, cf partie 1.1.1), qui consomme la moitié du carbone fourni par la photosynthèse (Luo 2007 ; Woodward 2002), va être amoindri par la hausse de la concentration en CO₂ fourni à la plante. Ainsi, les pertes de cet élément carbone par la photorespiration seront compensées par l'apport plus important de CO₂ (Ziska & Bunce 2006). Les espèces ayant un métabolisme acide crassulacéen (CAM) voient aussi leur taux photosynthétique augmenter (Ziska & Bunce 2006) ; il en est de même pour les espèces en C4 mais de façon plus faible (Ghannoum et al 2000 ; Ziska & Bunce 1997). De plus, Woodward (2002) observe, à court terme, moins de transpiration chez les espèces en C3 et en C4 car la conductance stomatale est réduite. Cette réduction de la conductance des stomates s'accroît avec le temps pour des plantes acclimatées au CO₂ (Ainsworth & Rogers 2007 ; Lee et al 2001 ; Woodward 2002). Ainsi l'augmentation du CO₂ entraîne un besoin plus faible en eau (DaMatta et al 2010) car la plante utilise plus efficacement l'eau dont elle dispose. Le métabolisme étant stimulé par l'augmentation du CO₂ atmosphérique, la quantité de photoassimilats produits par la photosynthèse sera plus importante et va être investie, en partie, dans la production de biomasse végétale (Reich et al 2006). Luo et al (2004) estiment

que la productivité primaire nette (NPP) devrait augmenter et entraîner une augmentation de 10^{15} g C au cours du 21^{ème} siècle. Cette accumulation du carbone est différente selon les compartiments structuraux de la plante. Dans l'étude de Luo et al (2006), quand la concentration en CO₂ est élevée, les quantités de carbone dans la partie aérienne, la racine et la plante entière augmentent, en moyenne, de 22,4 %, 31,6 % et 23,0 % respectivement. Cette production de biomasse végétale va entraîner, en particulier, une diminution du ratio partie aérienne/partie racinaire (Arnone et al 2000 ; Pritchard et al 1999). Cela s'explique par le fait qu'en condition de CO₂ augmenté, le carbone n'est plus un élément limitant. Ce sont les éléments minéraux et l'eau nécessaires à la croissance de la plante qui vont le devenir. La plante va donc allouer son énergie dans la production de racines (Pritchard et al 1999) afin d'explorer un volume de sol plus important et rechercher de nouveaux patchs nutritifs et donc *in fine* de prélever davantage de nutriments (Rogers et al 1996). En résumé, la plante alloue le carbone dans le développement de structures qui sont associées aux ressources limitantes (Ziska & Bunce 2006). En revanche, la respiration de la partie racinaire est augmentée du fait de la plus grande activité des racines. En effet, la prise de nutriments est un processus coûteux en énergie pour la plante et représente une part significative de la respiration racinaire (Norby & Jackson 2000). Cependant, Woodward (2002) rapporte que cette forte stimulation de la biomasse n'est pas durable. Sur des études à long terme sur *Pinus taeda* soumis à une hausse de la concentration en CO₂ atmosphérique de 200 ppm, la NPP augmente de 25 % à 34 % au cours des trois premières années puis n'est plus que de 6 % supérieure aux plantes témoins au cours des quatre années qui suivent. Lee et al (2001) mettent en évidence une stimulation minimum de la photosynthèse, après acclimatation des plantes aux conditions de CO₂ élevée de 560 ppm, de +15 % chez les monocotylédones en C3, +7,5 % chez les dicotylédones et -2 % chez les monocotylédones en C4.

Les effets de l'augmentation du CO₂ sur la phénologie ont été très peu étudiés et ne sont pas encore bien compris (Springer & Ward 2007). Wagner et al (2001) montrent qu'en affectant les mécanismes physiologiques, l'augmentation de ce gaz peut influencer la date d'apparition des fleurs et des graines. Avec une hausse du CO₂, DaMatta et al (2010) constatent que la plupart des espèces cultivées poussent plus vite et qu'il y a une légère modification dans les dates de floraison et d'apparition des fruits selon l'espèce considérée. Cleland et al (2006) mettent ainsi en évidence une divergence d'impact sur la floraison, suite à une augmentation du CO₂ à 680 ppm, entre les graminées et les plantes herbacées. La date de début de floraison est avancée de 2 à 4 jours chez les herbacées et est retardée de 2 à 6 jours chez les graminées.

Bunce (2008) a montré qu'en condition de CO₂ augmentée, les espèces se reproduisant davantage ne sont pas les mêmes qu'en condition ambiante de CO₂. En s'intéressant à quatre variétés de haricots, *Phaseolus vulgaris*, Bunce (2008) met en évidence une différence intraspécifique au niveau du rendement, exprimée en masse sèche de graines par unité de surface. Certaines variétés voient ainsi leur rendement augmenter ; la masse des graines ainsi que le nombre de graines par gousse ne change pas mais les plantes produisent davantage de gousses. D'autres variétés, en revanche, voient leur rendement diminuer puisque le nombre de gousses produites est plus faible. Or, les variétés ayant le plus fort et le plus faible rendement connaissent toutes les deux une augmentation de la photosynthèse, et les espèces pour lesquelles la photosynthèse diminue ont des rendements intermédiaires. Ces résultats aboutissent à la conclusion que ce ne sont pas forcément les espèces qui ont un taux photosynthétique plus important qui se reproduiront davantage et qui seront sélectionnées du point de vue de l'évolution.

Les effets décrits précédemment sont dus à la seule augmentation du CO₂. Or, en milieu naturel, les différentes composantes du changement global (CO₂, températures, disponibilité en eau et nutriments) interagissent provoquant des effets et des réponses plus complexes au niveau des plantes.

3.1.2. Augmentation des températures

La hausse des températures est un facteur considéré comme concomitant à l'augmentation du CO₂. Certains processus physiologiques comme la photosynthèse et la respiration seront affectés par ce facteur. Les espèces en C3 seront particulièrement touchées puisque l'augmentation de la température va accroître les pertes en carbone par le processus de photorespiration. En effet, l'augmentation de la température favorise la spécificité enzymatique de la Rubisco avec l'O₂ en défaveur de l'affinité de cette enzyme avec le CO₂ (Kirschbaum 2004). Certaines études montrent que les espèces vivant dans un climat froid seront plus sensibles à des hausses de températures (Arft et al 1999 ; Chapin et al 1995, 2008). Chapin et al (2008) ont ainsi montré qu'en Arctique, avec les hausses de température, la photosynthèse et la respiration étaient augmentées. Il peut aussi exister une grande variabilité de réponse à une forte concentration en CO₂ selon la température atmosphérique (Morison & Lawlor 1999) et la température au niveau des racines (Ziska 1998). Chez des espèces comme le soja, Ziska & Bunce (1998) ont montré que la respiration était inchangée voire plus faible en condition de CO₂ augmenté combiné à une hausse des températures. Dans le cas d'une exposition prolongée à de fortes températures, la plante peut développer des mécanismes lui

permettant de s'acclimater puis de s'adapter à cette nouvelle condition de croissance (He & Dong 2003 ; Valladares et al 2007). Cela aboutit alors à un nouvel équilibre entre photosynthèse et respiration (Zhou et al 2007). Ces effets peuvent donc conditionner la réponse au CO₂. De même, Ziska (1998) constate, dans ses travaux sur le soja, que le passage de 25 à 30 °C provoque une augmentation significative de la fixation de CO₂. Cependant cette stimulation de la photosynthèse est atténuée au cours du temps, ce qui confirme le phénomène d'acclimatation photosynthétique. Il existe tout de même une grande variabilité de réponses à la température qui dépend du type d'écosystème étudié (Lloyd & Fastie 2002), de l'espèce (Chapin et al 1995 ; Llorens et al 2004a,b ; Loik et al 2000), ou d'autres facteurs tels que le stade de développement (He & Dong 2003) ou la disponibilité en eau et en nutriments (Ziska 1998).

Les différents stades de développement des plantes (ouverture des feuilles, apparition des fleurs...) sont influencés par les conditions climatiques présentes durant les stades végétatifs et de dormance, ainsi que par la photopériode (Chapin et al 2008 ; Menzel 2000). La hausse des températures est donc un facteur qui affecte les dates de début et fin de croissance végétative. Kramer (1995) a ainsi étudié l'effet de l'augmentation des températures sur la phénologie de 7 espèces d'arbres européens et constate des différences interspécifiques. *Larix decidua* et *Quercus robur* voient la durée de leur saison de croissance diminuer avec l'augmentation de la température, car la chute des feuilles est avancée de façon importante par rapport à leur date d'ouverture. Chez *Betula pubescens* et *Populus canescens*, l'ouverture des feuilles et leur chute sont avancées de la même façon, il n'y a donc pas de modification de la durée de croissance. Enfin, la durée de la période de croissance peut être plus longue comme chez *Tilia cordata* et *Fagus sylvatica* pour qui la date de chute n'est pas modifiée tandis que celle d'ouverture est avancée. De même, dans l'hémisphère Nord où les températures ont augmenté (Jones et al 1999), on observe un allongement de la saison de croissance pour certaines espèces (Walther et al 2002) et cela car la date de début est avancée et la date de fin reculée (Menzel et al 2003). La durée de la période de croissance augmenterait ainsi de 1,1 à 4,9 jours par décennies depuis 1951 (Menzel et al 2003). La température affecte aussi la floraison dans le sens d'une accélération du développement. Cleland et al (2006) mettent en évidence une avancée de la date de début de floraison de 2 à 5 jours chez de nombreuses espèces annuelles.

Le stade de remplissage des graines cultivées qui va conditionner la masse des graines (DaMatta et al 2010) est également affecté par la hausse de température. Or la masse des graines va déterminer la quantité de réserves disponibles pour le développement de la

plantule, et sera donc impliquée dans le succès reproducteur de la plante (Cash & Ditterline 1996 ; Cooper et al 1979 ; Fransen & Cooper 1976). On peut alors s'attendre à des conséquences sur de nombreuses espèces cultivées pour leurs graines telles que les céréales (Barnabás et al 2008).

Ces différences dans la durée de la saison de croissance et dans les dates de floraison, avec la hausse des températures, peuvent altérer les interactions compétitives entre espèces (Kramer 1995). Ainsi, des phénomènes d'invasions biologiques et des changements de diversité auront lieu (Stegen et al 2012). Les modifications de températures vont permettre à certaines espèces de trouver dans l'environnement qu'elles envahissent des conditions favorables à leur croissance (van der Putten et al 2010). Stegen et al (2012), en se basant sur des modèles théoriques, vont dans le sens d'une faible invasibilité dans les régions chaudes et d'une composition stable des espèces, alors qu'ils prévoient une forte invasibilité des communautés résidant dans les régions froides avec une modification plus fréquente de leur composition et des espèces présentes.

3.1.3. Disponibilité en eau

La conséquence principale d'un manque d'eau est une baisse de la disponibilité en nutriments pour la plante puisqu'ils se trouvent sous forme dissoute (Sardans et al 2012 ; Zhou et al 2007). Un manque d'eau peut aussi affecter la croissance de la plante en abaissant son taux de photosynthèse, puisque le manque d'eau inhibe la transpiration et provoque la fermeture des stomates (Ghannoum et al 2000 ; Reich et al 2006) ce qui limite la fixation du CO₂ (Nunes et al 2008). Cet effet négatif sur la photosynthèse va à l'encontre de celui du CO₂. L'eau va alors devenir l'élément limitant pour la photosynthèse. Oren et al (2001) ont ainsi montré une diminution de 27 % de l'accumulation du carbone quand l'humidité du sol au niveau de la racine passe de 0,32 à 0,14 m³m⁻³.

Concernant le développement, un stress hydrique peut avoir pour conséquence d'accélérer la sénescence des feuilles (Prieto et al 2008). Il existe aussi une différence selon l'espèce. Sherry et al (2007) qui se sont intéressés à la phénologie du fleurissement et de l'apparition des fruits dans une prairie d'Amérique du Nord, ont constaté que la hausse des températures avançait ces deux stades chez les espèces qui commencent à fleurir avant le pic de chaleur de l'été mais retardait la reproduction des espèces qui commencent leur fleurissement après ce pic de température.

3.1.4. Disponibilité en nutriments

L'effet stimulant du CO₂ sur la croissance est souvent conditionné par la disponibilité en nutriments (Lee et al 2001 ; Woodward 2002), et en particulier par l'azote (Luo et al 2004 ; Luo 2007 ; Oren et al 2001 ; Rogers et al 2006). Il faut approximativement 0,005 g d'azote pour accumuler 1 g de carbone dans la biomasse végétale (Luo et al 2006). L'effet fertilisant du CO₂ va donc dépendre du rapport carbone/azote (ratio C/N) dans la plante (Reich et al 2006). Oren et al (2001) ont ainsi mis en évidence une augmentation de près de 130 % de la croissance de *Pinus taeda* avec un apport en nutriments, en condition enrichie en CO₂. Or, quand la plante accumule davantage de CO₂, elle va accumuler davantage d'azote (Luo et al 2006). Le ratio C/N est donc plus grand en condition de CO₂ augmenté (Drake et al 1997). Weigel & Manderscheid (2012) constatent, qu'avec une augmentation du CO₂, il se produit une diminution de la teneur en azote chez des espèces cultivées (betterave à sucre, ray-grass anglais, orge et blé d'hiver) qui varie entre 4,9 et 17 %. Ainsi, la qualité nutritionnelle des plantes cultivées s'avère moins bonne puisque les plantes contiennent moins d'azote, qui constitue une source importante de protéines (DaMatta et al 2010). Les effets positifs de la hausse du CO₂ sur les plantes en terme quantitatif (biomasse) vont être contrebalancés par des effets négatifs sur les plantes en terme qualitatif (diminution des protéines, des éléments minéraux nutritifs et composition lipidique altérée) (DaMatta et al 2010). Il a ainsi été montré que l'augmentation du taux de CO₂, ainsi que la hausse des températures pouvaient avoir un impact sur l'herbivorie (Zvereva & Kozlov 2006) en raison de leurs effets sur la teneur en azote de la plante (Tylianakis et al 2008). Il semblerait que la qualité nutritionnelle pour les insectes ou les herbivores soit plus faible dans le cas de plantes exposées à une forte concentration en CO₂ (Drake et al 1997). En effet, la teneur en azote dans la feuille est plus faible dans un sol limité en azote (Woodward 2002) suite à la hausse du CO₂. L'étude de Bunce (2008) confirme cette réduction significative de la concentration en azote dans les feuilles de quatre variétés de *Phaseolus vulgaris* en condition de CO₂ augmentée. Logan et al (2003) montrent que la sensibilité des insectes ravageurs et des agents pathogènes aux changements globaux pourrait aboutir à une redistribution de ces organismes entraînant des invasions dans de nouveaux habitats. D'un point de vue qualitatif, certaines études montrent que la composition des composés carbonés libérés par la plante sera aussi modifiée suite à un enrichissement en CO₂ (Finzi et al 2006). Les rhizodépôts sont plus riches en carbone et moins riches en azote.

La plante a donc besoin d'acquérir de l'azote pour s'assurer une croissance optimale. L'acquisition d'azote se fait par l'extension du système racinaire, l'assimilation de l'azote

minéral ou la fixation biologique de l'azote atmosphérique. Or, pour tous ces niveaux de prise d'azote, il peut se produire une limitation. L'azote minéral est préférentiellement prélevé par la plante et il peut également être soumis aux conditions environnementales ou aux conditions de culture. Ainsi, une forte teneur en eau peut entraîner des pertes de cet élément par lessivage, le rendant ainsi moins disponible pour la plante. La fixation biologique, quant à elle, est réalisée par des microorganismes. Or, il se produit une limitation progressive en azote (Luo et al 2004) car il est aussi utilisé par ces microorganismes telluriques pour la décomposition de la matière organique du sol (Luo et al 2006). En effet, certaines études (Johnson et al 2003 ; Kuzyakov et al 2007 ; Zak et al 2000) ont montré que ces microorganismes pouvaient entrer en compétition avec les plantes expliquant ainsi les phénomènes de limitation en nutriments. Un fort rapport C/N correspondra donc à une faible teneur en azote ce qui peut inhiber la croissance de la plante (Luo et al 2006). Dans un sol fertile, en revanche, une plante disposera d'azote et l'élément limitant sera alors le carbone, la plante allouera alors davantage d'énergie dans la croissance des feuilles pour acquérir ce carbone (Pritchard et al 1999). Cependant, d'autres éléments peuvent alors devenir limitants (Hungate et al 2004). Sardans et al (2012) dans leur étude bibliographique sur la teneur en C, N et P dans les plantes en condition de CO₂ augmenté, constatent qu'en moyenne la hausse du CO₂ conduit à une augmentation de 22 % du ratio C/N des feuilles des graminées en C3, des plantes herbacées et des plantes ligneuses, mais qu'il n'y a pas d'effet sur ce ratio chez les plantes en C4. De plus, en moyenne, il y a une hausse de 38 % du ratio C/P des feuilles des espèces en C3 et pas d'effets pour les espèces en C4. Un apport en azote et phosphore minéral sera efficace mais il va être en grande partie perdu par lessivage (Sardans et al 2012 ; Woodward 2002) et entraîner les problèmes connus de pollution qui l'accompagnent.

Il va alors se produire une compétition pour ces ressources limitantes qui peut modifier les interactions entre espèces et donc la composition des communautés (Ryabov & Blasius 2011). C'est le cas de l'émergence de certaines espèces invasives. Ainsi, Rimer & Evans (2006) ont montré que *Bromus tectorum*, qui est une espèce invasive en Amérique du Nord, utiliserait plus efficacement les communautés fixatrices d'azote que les espèces indigènes ce qui lui permettrait d'être plus compétitive. Cette étude est confirmée par celle de Liao et al (2008) qui montre que, globalement, dans les écosystèmes constitués de plantes invasives, la concentration en N dans les plantes et les concentrations en NH₄⁺ et NO₃⁻ dans le sol sont respectivement 40 %, 30 % et 17 % plus fortes que dans un écosystème natif. Cela est dû à une augmentation de la minéralisation de l'azote par les microorganismes telluriques. Cette étude montre ainsi que les espèces invasives peuvent modifier le nouvel écosystème

qu'elles colonisent, avec parfois un rôle de renforcement des changements globaux (Hawkes et al 2005) et une modification de la composition et la diversité des communautés végétales.

Ces résultats dépendent des conditions expérimentales, comme le type de traitement azoté ou le type d'écosystèmes (Luo et al 2006). Luo et al (2006) ont ainsi montré que les forêts et les prairies accumulaient davantage d'azote en condition enrichie en CO₂ que les espaces désertiques ou les zones humides. Mais tous ces effets sur la physiologie de la plante sont dépendants de la durée d'expérimentation. Un effet stimulant du CO₂ pour la croissance est souvent constaté durant les premières années d'expérimentation puis au cours du temps l'effet est annulé ou inversé à cause des phénomènes de limitation en nutriments (Oren et al 2001 ; Ziska 1998). Il en est de même pour la température car il y a des phénomènes d'acclimatation de la part des plantes (Chapin et al 1995). Les effets à courts termes peuvent donc être de mauvais prédicteurs des conséquences à long terme des changements globaux (Chapin et al 1995). Les conséquences sont également différentes en fonction des espèces utilisées ou des propriétés du sol, comme la teneur en carbone et azote ou la quantité d'eau disponible par exemple. En plus de cette variation de réponses liée aux conditions expérimentales, il existe des interactions complexes entre les différents paramètres du changement global. Ainsi, la hausse des températures couplée à l'augmentation du CO₂ va altérer le cycle de l'azote qui va en retour conditionner la réponse de la plante au CO₂ (Reich et al 2006). Des interactions existent aussi avec d'autres variables abiotiques (pH, disponibilité pour d'autres nutriments...) mais elles sont plus compliquées et moins étudiées (Bunce 2008). Il y a donc une grande variabilité de réponses intraspécifiques et interspécifiques des espèces végétales face aux divers facteurs du changement global et à leurs interactions. Cela aboutit à une altération des interactions compétitives entre espèces et, à terme, à des modifications dans la composition, la diversité et l'abondance des espèces végétales présentes au sein d'une communauté (Llorens et al 2004a).

3.2. Effets sur les microorganismes

Parmi les effets directs, les processus régulés par les microorganismes, qui ont un rôle essentiel au sein de l'écosystème, comme la décomposition, la minéralisation, les processus d'oxydo-réduction (par exemple, la nitrification et dénitrification), sont influencés par les conditions environnementales, ce qui signifie que les changements globaux affecteront ces processus. Ainsi, Rustad et al (2001), dans leur revue de synthèse, montrent qu'une hausse moyenne de température expérimentale de 2,4 °C durant 2 à 9 ans provoque une

augmentation moyenne de 46 % du taux de minéralisation de l'azote. Concernant l'augmentation du CO₂, liée aux changements globaux, les concentrations de cet élément dans le sol sont beaucoup plus importantes que dans l'atmosphère (entre 2 000 et 38 000 ppm). Les effets directs de l'augmentation atmosphérique de ce gaz sur les microorganismes seront donc négligeables comparés aux effets modulés par la plante (Drigo et al 2008).

Etant donné que les organismes vivants dans le sol sont hétérotrophes et dépendent de l'apport en carbone organique dérivé des plantes, l'activité et le fonctionnement des communautés microbiennes telluriques risquent d'être fortement influencés par des changements ayant lieu au niveau des plantes (Drigo et al 2008). Parmi ces changements, les altérations de la physiologie végétale peuvent entraîner des conséquences pour les symbiotes. De plus, les racines induisent des modifications de la quantité et la qualité du carbone libéré dans les sols ce qui va affecter les microorganismes utilisant ces composés carbonés (Drigo et al 2008 ; Finzi et al 2006). Dans ce cas, les modifications causées par la plante peuvent être liées directement à l'utilisation des composés par les microorganismes ou aux modifications de la structure du sol provoquées par les exsudats racinaires. Les répercussions pour les microorganismes, dues aux modifications de la plante avec laquelle ils interagissent, peuvent être un changement de densité, de diversité, de composition et d'activité des communautés (Figure 0.7).

3.2.1. Abondance des microorganismes

L'apport de composés carbonés au sol étant plus important en condition enrichie en CO₂, la biomasse microbienne va augmenter puisque les microorganismes libres disposent de davantage de nutriments pour leur croissance (Eisenhauer et al 2012 ; Williams et al 2000). Il en est de même pour les microorganismes symbiotiques. Treseder (2004) constate une augmentation de 47 % du nombre de champignons mycorrhizogènes en condition de CO₂ augmenté. En effet, l'augmentation du métabolisme de la plante entraîne des besoins plus importants en nutriments ce qui explique qu'elle investit davantage d'énergie pour favoriser la colonisation microbienne répondant à ses besoins (Drigo et al 2008). Cet effet a été constaté pour les champignons (Olesniewicz & Thomas 1999) comme pour les bactéries avec une augmentation du nombre de nodules (Temperton et al 2003). En revanche, l'effet inverse peut être constaté comme c'est le cas dans les agroécosystèmes utilisant des fertilisants. Treseder (2004) met en évidence une diminution de l'abondance des champignons mycorrhizogènes de 15 % avec un apport en azote et de 32 % avec un apport en phosphore. Cela s'explique par le fait que les interactions symbiotiques deviennent accessoires pour la plante qui dispose

d'éléments minéraux facilement accessibles. Elle peut ainsi s'affranchir du coût métabolique engendré par la mise en place des associations symbiotiques pour la prise de ces nutriments (Morgan et al 2005). Cependant, il existe une grande variabilité de réponses et certaines études ne révèlent aucun changement de biomasse microbienne (Hungate et al 2000 ; Phillips et al 2002).

Concernant les changements de pratiques agricoles, leur impact sur la structure du sol peut provoquer soit une diminution de la biomasse microbienne (Postma-Blaauw et al 2012), soit aucune modification de la biomasse totale mais un changement dans la distribution spatiale de cette biomasse. Par exemple, van Capelle et al (2012) ne détectent pas d'effet sur la biomasse des microorganismes dans un sol travaillé de façon intensive (labour conventionnel avec un travail mécanique de retournement du sol). Cependant, ils remarquent que la distribution verticale de la biomasse microbienne change. Pour un travail intensif du sol, la biomasse microbienne se situe entre 0 et 30 cm alors qu'elle se situe entre 0 et 10 cm pour un travail plus modéré du sol (labour de conservation avec un travail mécanique minimal et superficiel et la conservation des résidus de récolte sur le sol). Cela s'explique par le fait qu'un travail modéré du sol entraîne une augmentation de 63 % du Carbone minéral, de 53 % de l'Azote minéral, de 39 % du Phosphore minéral et de 2 % du Soufre minéral et donc un meilleur approvisionnement en nutriments. En effet, avec un travail réduit du sol, les résidus de culture procurent une source de matière organique de bonne qualité par rapport à un sol travaillé intensivement.

Enfin la dessiccation due au manque d'eau est un facteur pouvant réduire la viabilité microbienne (Vriezen et al 2007).

3.2.2. Diversité microbienne

Certains microorganismes ne seront pas adaptés aux modifications apportées par la plante d'où une possible réduction de la diversité microbienne. A titre d'exemple, Phillips et al (2002) ont montré qu'en condition de CO₂ enrichi les bactéries à Gram+ disparaissaient et celles à Gram- augmentaient d'où un phénomène de compensation au niveau de la biomasse microbienne mais une perte de diversité des bactéries à Gram+. He et al (2012) ont testé l'effet d'une hausse de la concentration en CO₂ à 560 ppm sur la diversité microbienne sur une période de 10 ans dans un sol de prairie. La richesse taxonomique est réduite suite à la hausse du CO₂ dans certains phylums microbiens (Proteobactéries, Firmicutes, Actinobactéries, Bacteroidetes et Acidobactéries). Les Proteobactéries dont la diversité est affectée constituent le phylum le plus représenté et sont impliqués dans le cycle de nombreux

nutriments (C, N, S) (Kersters et al 2006). De même, Lesaulnier et al (2008) constatent avec la même concentration en CO₂ que l'abondance totale des bactéries ne change pas mais que les changements interviennent dans la diversité, c'est-à-dire que certains groupes microbiens seront plus représentés et que d'autres vont disparaître.

Cependant, la réduction de la diversité microbienne est principalement due aux activités anthropogéniques qui perturbent les sols (Gans et al 2005) comme, par exemple, les apports d'intrants chimiques (Hussain et al 2009 ; Lilleskov et al 2002) ou le travail du sol (Kihara et al 2012 ; Postma-Blaauw et al 2012). Postma-Blaauw et al (2012) se sont intéressés à la diversité taxonomique des bactéries dans un sol de prairie transformé en sol cultivable. Ils remarquent qu'une intensification de l'usage du sol (travail du sol, fertilisation minérale, réduction de la diversité des cultures) affecte négativement la diversité taxonomique des bactéries. Kihara et al (2012) montrent que ce n'est pas uniquement l'intensité du travail du sol qui affecte la diversité spécifique des microorganismes mais aussi la diversité des espèces cultivées. En effet, une rotation de type soja-maïs entraîne une diversité spécifique plus importante que dans le cas d'une monoculture de maïs. Cet exemple démontre ainsi l'importance des relations entre diversité végétale et diversité microbienne.

Du point de vue de l'évolution, le temps de génération des microorganismes étant court, on peut s'attendre à des phénomènes d'adaptation évolutive et à l'apparition de nouvelles espèces microbiennes. Des phénomènes d'adaptation déjà ont été montrés face à des disponibilités en carbone et azote, altérées par les changements globaux (Goddard & Bradford 2003 ; Treseder 2004). Goddard & Bradford (2003) ont ainsi montré que le champignon *Saccharomyces paradoxus* est capable de s'adapter à une limitation en carbone. Les générations émergeant de l'individu ancestral, ayant subi la limitation en carbone, sont capable de séquestrer davantage cet élément en comparaison à leur ancêtre. Ils deviennent alors plus compétitifs que l'individu ancestral en condition de limitation en carbone.

3.2.3. Activité des microorganismes

Il peut aussi y avoir une modification de l'activité des communautés microbiennes due à la modification de la quantité et de la qualité des exsudats racinaires (Kuzyakov et al 2007). Finzi et al (2006) ont mis en évidence une modification de l'activité des enzymes impliquées dans la dégradation de la matière organique en réponse à la modification du type de composés apportés au sol par la plante. Cette étude réalisée sur une durée de 5 ans, en condition de CO₂ augmenté (570 ppm), a aussi montré le caractère dynamique de la réponse des communautés microbiennes. Durant les deux premières années de l'expérimentation, il y a une

augmentation de la décomposition du carbone labile, celui qui est apporté au sol par la plante. Cet accroissement du métabolisme microbien (Zak et al 2000) est accompagné de l'augmentation de la respiration microbienne (Finzi et al 2006 ; Phillips et al 2002). A partir de la troisième année, l'activité microbienne est différente selon la source de carbone (fournie par la plante ou présente dans le sol). Au bout de 5 ans, en revanche, il y a dégradation du carbone stable qui se trouve dans les strates inférieures du sol. En effet, il constate l'augmentation considérable d'une enzyme particulière, la Phenol oxidase, qui est associée à la dégradation des composés stables et difficilement dégradables. Cela traduit donc une modification du métabolisme d'utilisation du carbone des microorganismes telluriques. En effet, l'activité microbienne, à l'origine orientée vers l'acquisition du carbone, va être dédiée à l'acquisition d'autres éléments tels que l'azote et le phosphore. Carney et al (2007) ont montré dans leur étude, qu'un doublement de la concentration en CO₂ sur une période de 6 ans entraînait une diminution de la quantité de carbone stocké dans le sol. Cela s'explique par une augmentation de l'activité enzymatique des microorganismes liée à la dégradation du carbone. Ce phénomène provoque une libération de CO₂ due à la respiration microbienne. Or, le sol qui est considéré comme un puits de carbone peut alors s'avérer devenir une source de carbone et peut alors intervenir comme élément de forçage sur la hausse du CO₂ atmosphérique.

Enfin, certaines études montrent que l'augmentation de la température a un effet stimulant sur les mécanismes de dégradation de la matière organique (Kuznyakov et al 2007), de respiration et de minéralisation (Rustad et al 2001).

3.2.4. Composition des communautés microbiennes

La composition des communautés microbiennes peut être remaniée en raison des variations de réponses des microorganismes aux changements globaux. La plupart des études réalisées en conditions enrichies en CO₂ mettent en évidence une augmentation des champignons au détriment des bactéries (Carney et al 2007 ; Drigo et al 2008 ; Phillips et al 2002). Cela s'explique par le fait qu'ils sont davantage stimulés par les nouveaux composés libérés par la plante en condition de CO₂ augmenté car ils sont plus aptes à décomposer ces molécules que les bactéries (Phillips et al 2002). D'autre part, les champignons ont un ratio C/N plus fort que les bactéries, ils ont donc besoin de moins d'azote que les bactéries pour leur croissance (Treseder 2004). Or, comme l'azote est un élément qui devient limitant en condition de CO₂ augmenté, ils survivent mieux que les bactéries et sont moins en compétition avec la plante (Phillips et al 2002 ; Wardle et al 2004). Le ratio champignons/bactéries va donc augmenter

suite à une hausse de CO₂ (Carney et al 2007). Fierer et al (2012) mettent en évidence que la teneur en azote peut jouer sur la composition de la communauté microbienne en favorisant certains groupes bactériens tels que les Proteobactéries et les Bactéroidetes. Les Acidobactéries, quant à elles, voient leur abondance diminuer en cas de forte concentration en azote. Ces dernières sont caractérisées par un taux de croissance plus lent et un besoin plus faible en nutriments à l'inverse des deux autres groupes. Ceci explique que les Proteobactéries et les Bactéroidetes soient favorisées et deviennent plus compétitives dans de telles conditions. Cela met en évidence les différentes stratégies reproductives existant. On distingue ainsi les espèces ayant une stratégie r qui ont un taux de reproduction et de mortalité élevés. Elles sont adaptées à des environnements instables et nécessitent moins de ressources. En revanche, les espèces à stratégie K ont un faible taux de reproduction et une durée de vie plus longue. Elles ont besoin de davantage de ressources durant leur période de développement plus longue (MacArthur & Wilson 1967 ; Reznick et al 2002). De plus, le changement dans la composition des rhizodépôts peut résulter en un changement d'utilisation de ces composés par les microorganismes se situant au niveau de la rhizosphère (Denef et al 2007). Une modification de la composition des communautés microbiennes en découle alors. Des travaux montrent que certains genres bactériens, comme les *Pseudomonas*, investis dans l'approvisionnement en nutriments de la plante, vont voir certaines de leurs espèces devenir plus abondantes en condition de CO₂ augmenté. C'est le cas des espèces de *Pseudomonas* fluorescents, responsables de la production de sidérophores qui permettent à la bactérie de fixer du fer. Il en est de même pour les espèces responsables de la réduction du nitrate puis de la fixation de cet élément. Cependant, cela contribue à rendre ces éléments minéraux (fer, nitrate) indisponibles pour les plantes (Tarnawski et al 2006).

Enfin, la texture du sol et le type de culture caractérisant les sols cultivés ont un impact sur les communautés microbiennes qui y résident (van Capelle et al 2012). Kihara et al (2012) mettent en évidence l'importance de la structure physique du sol et des agrégats qui le composent. Un travail intense du sol conduit à une augmentation de la masse des agrégats de 19 à 34 % par rapport à un sol où le travail est réduit ce qui modifie la structure et la composition des communautés microbiennes.

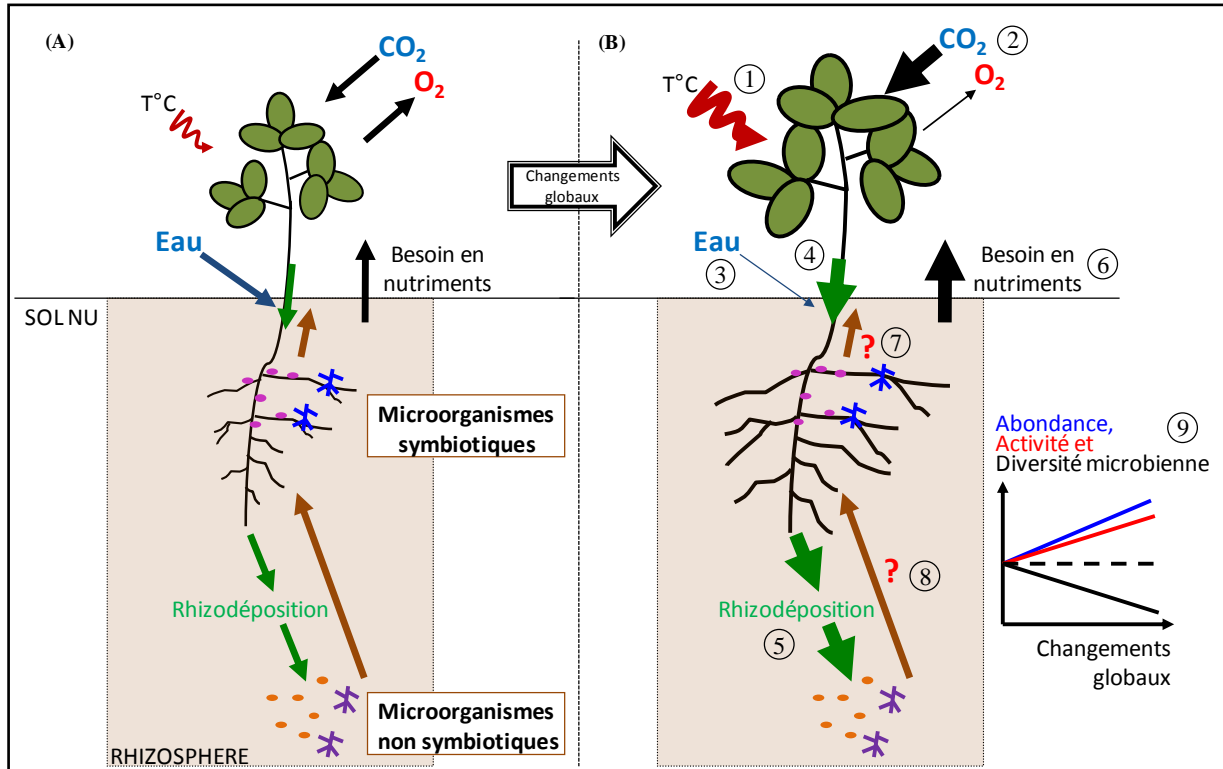


Figure 0.7 Effets à court terme, les plus fréquents, des changements globaux affectant la plante et les microorganismes rhizosphériques avec lesquels elle interagit. Interactions plante-microorganismes en conditions (A) ambiantes et (B) soumises aux différents facteurs du changement global. (B) A court terme, la plupart des études mettent en évidence une augmentation de la biomasse végétale totale. (1) Les changements globaux entraînent une température plus élevée ; (2) la concentration en CO_2 atmosphérique est aussi plus importante ; (3) enfin la quantité d'eau fournie à la plante est généralement soumise à des limitations. (4) La photosynthèse est alors plus importante et davantage de photosynthétas sont d'abord fournis aux microorganismes symbiotiques ; (5) les microorganismes non symbiotiques sont les derniers à recevoir les composés carbonés en quantité plus importante ; (6) en conséquence, le métabolisme de la plante étant augmenté, la plante a besoin de davantage de nutriments ; (7) les nutriments sont fournis à la plante, en premier lieu, par les microorganismes symbiotiques ; (8) puis, les microorganismes non symbiotiques vont fournir des nutriments à la plante dont la composition et la quantité risquent d'être affectés par les changements environnementaux subis par la plante. (9) La plupart des études concernant le devenir, à court terme, des microorganismes rhizosphériques suite aux changements affectant la plante montrent une augmentation de l'abondance et de l'activité microbienne mais une réduction de la diversité.

3.3. Evolution des interactions plantes-microorganismes

Concernant tous ces changements globaux et leurs conséquences néfastes sur les compartiments végétal et microbien, il faut cependant prendre en compte l'évolution des espèces et leur capacité à s'adapter. Ces paramètres peuvent faire varier les prédictions émises face aux effets des changements globaux (Stegen et al 2012).

Les interactions entre les plantes et les communautés microbiennes du sol reposent sur des bases de signalisation/communication mais surtout sur des relations trophiques. Les plantes dépendent des microorganismes pour leur nutrition et leur santé et les microorganismes dépendent des plantes pour leur fournir les nutriments nécessaires à leur croissance. Cela est d'autant plus vrai lorsqu'il s'agit d'une symbiose entre la plante hôte et le microorganisme symbiotique (Thrall et al 2007). En effet, dans ce cas, il y a une plus ou moins forte spécificité entre les deux partenaires ce qui implique qu'ils vont coévoluer au cours du temps (Thompson 2001 ; Thrall et al 2007). C'est le cas, par exemple, de certaines espèces de champignons qui sont passées de parasites à mutualistes (Kemen & Jones 2012). Les dégâts infligés à la plante lors de la symbiose parasite sont trop importants et entraînent la mort de la plante hôte ou une production de rhizodépôts trop faibles. Par conséquent, les services rendus par la plante envers les microorganismes ne sont plus assurés ou le sont trop faiblement. Le parasite symbiotique est dans ce cas contraint de limiter sa virulence envers la plante hôte afin que celle-ci lui procure les services dont il a besoin. Par la suite la plante limite ses systèmes de défense immunitaire envers le parasite et permet la colonisation du microorganisme symbiotique. Dans un tel contexte, on peut assister au passage d'une symbiose parasite à une symbiose mutualiste. C'est également l'hypothèse généralement émise pour expliquer l'apparition des champignons mycorhiziens (Brundrett 2002 ; Thompson 2001).

Une fois la symbiose mise en place, pour que chaque partenaire continue à en bénéficier, il est nécessaire que les changements affectant l'hôte, et le contraignant à évoluer pour s'adapter, entraînent également une évolution de son symbiote. L'étude de Heath & Tiffin (2007) a montré que ce phénomène de coévolution contribue, par exemple, à maintenir une diversité au sein des rhizobia. En fonction du génotype de la plante hôte ou de la quantité d'azote dans le sol, qui sont des paramètres pouvant varier au cours du temps, les souches mutualistes de rhizobia les plus efficaces ne seront pas les mêmes à interagir avec la plante et varieront également au cours du temps. En fonction du type de plante et des paramètres de l'environnement, la coévolution des deux partenaires permet le maintien de diverses souches mutualistes de rhizobia (Thompson 2001). Ainsi dans le cas de variations affectant l'un des

deux partenaires, l'autre va s'adapter en régulant son métabolisme, dans un premier temps, et si cela améliore sa fitness, l'espèce va évoluer selon ce nouveau métabolisme.

Les plantes ont ainsi la capacité de s'adapter à une nouvelle condition environnementale grâce à leur plasticité phénotypique, c'est-à-dire les différents phénotypes qu'elles peuvent exprimer à partir de leur unique génotype (Nicotra et al 2010 ; Schlichting 2002). En effet, elles peuvent faire preuve, dans un environnement modifié, d'une plasticité adaptative leur permettant de retrouver une meilleure fitness, c'est-à-dire un nouvel optimum phénotypique (Ghalambor et al 2007). La plasticité phénotypique des plantes va concerner leurs traits fonctionnels déterminants pour leur phénologie, physiologie et reproduction (durée de la phase végétative, biomasse végétale, taille des graines,...) (Nicotra et al 2010). Ainsi dans un nouvel environnement, cette plasticité phénotypique va lui permettre de s'adapter et résister aux changements dans une certaine gamme d'intensité de modification environnementale (Crispo et al 2010). Cette capacité peut aussi permettre à une espèce végétale de mieux s'adapter dans un environnement qu'elle colonise, comme c'est le cas des espèces invasives (Davidson et al 2011 ; Hulme 2008). Lorsqu'elle est adaptative, et donc bénéfique pour la survie et la reproduction, alors la plasticité phénotypique peut permettre une évolution de l'espèce dans les nouvelles conditions (Matesanz et al 2010 ; Thibert-Plante & Hendry 2011). La variabilité des réponses des espèces végétales, face aux divers facteurs du changement global, constitue la plasticité phénotypique. La phénologie est, par exemple, le trait le plus largement affecté par la plasticité dans le règne végétal (Matesanz et al 2010 ; Menzel et al 2006).

Les microorganismes, eux, vont également montrer une certaine plasticité phénotypique (Callahan et al 2008). Leur taux de croissance est cependant relativement court. On peut donc s'attendre à des évolutions plus rapides des espèces microbiennes, d'autant plus que les microorganismes possèdent de nombreux systèmes de transferts de gènes entre eux (Brencic & Winans 2005 ; Wu et al 2011).

Au sein de l'interaction plante-symbiote chacun peut donc s'adapter et évoluer dans une certaine mesure en réponse aux changements globaux. En effet, les coûts métaboliques nécessaires à l'adaptation sont parfois trop élevés et cela conduit à des modifications de l'interaction plante hôte-microorganisme symbiotique voire à sa perte.

La plante hôte peut voir son adaptation limitée dans le cas où les conditions environnementales changent rapidement et ne sont plus favorables (Newton et al 2010 ; Vallardes et al 2007). Des épisodes de forte mortalité ont ainsi été montrés dans certaines forêts parasitées par des microorganismes, dont la virulence est en général limitée par le

système immunitaire de l'hôte, suite à des événements de sécheresse ou de fortes températures (Visser et al 2011). Davidson et al (2011) constatent que les espèces invasives, malgré leur plasticité phénotypique, seraient globalement plus affectées que des espèces natives par rapport à un manque de nutriments ou des conditions stressantes.

Les microorganismes ont aussi une certaine limite de leur plasticité phénotypique et sont adaptés aux conditions environnementales dans lesquelles ils se sont développés. Un changement brutal des conditions de vie au cours de la croissance implique souvent une moins bonne fitness des microorganismes (Wilson & Lindow 1993). De plus, les microorganismes symbiotiques vivant dans un environnement relativement constant (leur hôte), la taille de leur génome diminue ce qui peut être un frein à une adaptation lorsque l'hôte va être affecté par un changement environnemental (Snell-Rood et al 2010).

La réponse des compartiments végétal et microbien ainsi que la dynamique des interactions plante hôte - microorganismes en fonction des divers paramètres environnementaux semble être un bon moyen pour comprendre comment les deux partenaires pourront évoluer dans un contexte de changement global.

4. Perspectives

4.1. Un système complexe avec de multiples interactions

Il est compliqué de prédire les conséquences à long terme des changements globaux. D'une part, en raison de l'interaction entre les différents facteurs du changement global, et d'autre part en raison des interactions entre les microorganismes victimes de ces changements eux-mêmes (Wardle et al 2011). En effet, les relations trophiques qui relient les différents organismes de nos écosystèmes entraînent une cascade de conséquences quand un des maillons de la chaîne trophique est affecté (Dyer & Letourneau 2003 ; van der Putten et al 2004). L'abondance des plantes est, par exemple, contrôlée par des interactions trophiques à différents niveaux (herbivores, pathogènes, symbiotes et leurs prédateurs respectifs) (van der Putten et al 2010). De plus, il est difficile de distinguer les conséquences des changements globaux car il faut prendre en compte leurs effets directs sur les plantes et les microbes et leurs effets indirects par l'intermédiaire de l'autre organisme. Il faut noter que dans la majorité des études réalisées sur l'effet des changements globaux sur les plantes, les expérimentations se font avec un sol contenant des microorganismes. Il est alors difficile de connaître l'implication des microorganismes dans la réponse des plantes étant donné la forte interaction qui existe entre ces deux compartiments de l'écosystème. En effet, comme le

montrent les divers exemples discutés dans cette synthèse bibliographique, la plupart des changements affectant la plante sont liés aux microorganismes et réciproquement.

Au vu des diverses études réalisées sur les changements globaux, on pourrait s'attendre à ce que les espèces végétales, qui voient leur croissance augmenter ou leur reproduction favorisée par les variations environnementales (hausse du CO₂, hausse des températures,...), se reproduisent davantage et soient sélectionnées dans la population. Ces études sont réalisées, en général, en chambre de culture ou en serres, autrement dit, dans des conditions qui limitent la compétition entre les plantes, afin de bien appréhender l'effet du traitement que l'on étudie. Cependant, en conditions naturelles, les espèces végétales sont en compétition et les diverses composantes du changement global sont imbriquées. Par exemple, la réponse au CO₂ va dépendre d'autres facteurs, comme la température, la disponibilité en eau, en nutriments... Ainsi, l'étude de (Bazzaz et al 1995) montre qu'en condition de CO₂ augmenté ce ne sont pas les espèces qui répondent le mieux à l'augmentation du CO₂ qui vont être sélectionnées. En effet, les génotypes sélectionnés sont ceux qui ont une plus grande compétitivité pour d'autres ressources que le CO₂, autrement dit pour les éléments qui deviennent limitants en condition enrichie en CO₂ (azote, phosphore...). Or, cette compétitivité est régulée par les microorganismes avec lesquels les plantes sont en interaction. En effet, les microorganismes contrôlent la décomposition de la matière organique à travers la production d'enzymes extracellulaires. Ils contrôlent donc le flux de nutriments minéraux utilisables pour la plante. En concentration augmentée en CO₂ par exemple, le changement des fonctions microbiennes aura un impact sur la production primaire (Finzi et al 2006). L'évolution des communautés végétales est donc liée aux relations que la plante entretient avec les communautés microbiennes.

Il en est de même pour l'évolution de ces communautés microbiennes qui va dépendre des relations trophiques entretenues avec la plante. Par exemple, l'abondance des champignons mycorrhizogènes va être régulée par la plante hôte (Treseder 2004). Ces champignons sont moins efficaces dans leur rôle de facilitation du captage d'azote inorganique par la plante que du phosphore inorganique. C'est donc la plante qui va ajuster son allocation du carbone dans les associations avec des champignons mycorrhizogènes selon si sa croissance est limitée par l'azote ou par le phosphore (Treseder 2004).

On comprend alors, au vu des interactions trophiques qui existent entre plantes et microorganismes, que les effets sur les plantes se répercutent sur les communautés microbiennes avec lesquelles elles interagissent et inversement (Drigo et al 2008). Les changements globaux qui vont modifier les différents niveaux du cycle des nutriments créent

ainsi des déséquilibres au niveau des interactions entre plantes et microorganismes. Cela se traduira par des modifications des phénomènes de régulation, entre les deux partenaires, engendrées par les changements globaux et dépendantes de nombreux facteurs environnementaux, eux-mêmes affectés par les changements globaux.

4.2. Systèmes expérimentaux d'étude des interactions plantes-microbes

Dans toutes les études s'intéressant aux changements globaux, la variation des méthodes d'étude complique les interprétations et empêche de faire des généralisations. Concernant les travaux sur les conséquences d'une augmentation du CO₂ sur les plantes par exemple, les conditions expérimentales sont très différentes (chambres de culture, serres, plantes en pot) tout comme les méthodes d'enrichissement en CO₂ (DaMatta et al 2010 ; Luo et al 2006). L'avantage des méthodes d'enrichissement en CO₂ de l'air libre (FACE, Free Air CO₂ Enrichment) est qu'elles permettent de travailler dans des conditions de champs et sur une plus large gamme d'espèces végétales. Les arbres, qui représentent un puits de CO₂ important face à l'augmentation atmosphérique de ce gaz, peuvent ainsi être inclus dans les analyses (Woodward 2002). Cependant, étant donnée la multitude d'interaction subsistant dans le sol, il est difficile de découpler les effets directs du CO₂ et les effets indirects dus aux microorganismes. A l'inverse, les études en serre ne permettent pas de savoir si les résultats sont extrapolables à des conditions de champs (Bunce 2008). Par ailleurs, les espèces végétales et microbiennes utilisées sont différentes et les réponses aux changements globaux sont spécifiques des espèces utilisées. De plus, dans un sol naturel, il existe une très grande diversité des microorganismes telluriques, dont seulement 0,1 à 1 % sont cultivables. Enfin, dans un milieu naturel, les différents paramètres du changement global interagissent entre eux, rendant difficile les interprétations.

Le travail pour comprendre la façon dont le changement global affecte les interactions plantes/microorganismes doit donc se faire par décomposition du système où seulement quelques variables changent. Ainsi, pour pouvoir analyser les interactions entre les deux partenaires, il est nécessaire de cibler un nombre restreint d'espèces végétales et microbiennes. En décomposant le système, il devrait être possible d'obtenir certains éléments de réponse qui peuvent être complétés par des études visant à ajouter dans le système d'autres facteurs du changement global, comme la température, la disponibilité en eau De plus, l'intérêt d'un système simplifié est qu'il permet de s'affranchir d'un certain nombre d'inconvénients qui ne permettent pas d'étudier les effets des changements globaux en milieu naturel. Les interactions biotiques, par exemple, masquent parfois les modifications apportées

par le changement global ou les phénomènes de compensation de biomasse entre les différentes espèces végétales (Kahmen et al 2006).

Dans un tel système simplifié, avec une vision coût-bénéfice des interactions, on peut comprendre comment les deux partenaires interagissent face aux changements globaux. La mesure des coûts et bénéfices du côté plantes et microorganismes repose sur des aspects quantitatifs ou qualitatifs liés aux traits fonctionnels des deux organismes. Concernant la plante, il s'agit des traits liés à sa croissance (biomasse, nombre de feuilles, teneur en carbone et azote...), son développement (phénologie) et sa reproduction (nombre de graines, taux de germination,...). Concernant les microorganismes, l'intérêt se porte sur leur abondance, leur diversité, leur activité et la composition des communautés lorsque les études portent sur une communauté microbienne dans son ensemble. Alors que les analyses concernant les plantes font davantage appel à des notions d'écophysiologie, pour les microorganismes, les analyses sont plus complexes et font appel aux domaines de la microbiologie, la biologie moléculaire (Anderson et al 2004 ; Delmont et al 2011 ; He et al 2012) et l'écologie évolutive.

4.3. Perspectives environnementales

Cette synthèse bibliographique met en avant l'intérêt d'étudier et de comprendre au mieux les effets des changements globaux sur les compartiments végétal et microbien et la résultante sur leur interaction. En effet, de telles analyses pourraient permettre d'apporter des solutions durables à des domaines soumis à des préoccupations majeures comme l'alimentation, l'agriculture et l'environnement. Les moins bons rendements agricoles déjà observés de nos jours (DaMatta et al 2010) rappellent qu'il est important de conserver l'ensemble des services écologiques fournis par les microorganismes. Certaines études s'emploient donc à l'élaboration de modèles pour prévoir l'impact des changements climatiques sur les agroécosystèmes (Supit et al 2012). Les microorganismes sont donc des bioindicateurs potentiels de la qualité des sols (van Capelle et al 2012). Certains programmes de recherche sont ainsi entièrement consacrés à l'état des lieux de la diversité des microorganismes présents dans les sols et leur évolution au cours du temps. De plus en plus de systèmes agricoles pratiquent un travail limité du sol (moins de fertilisants, moins de labour du sol...) comme cela a été initié aux Etats unis et en Allemagne (van Capelle et al 2012). En plus d'agir quotidiennement à l'amélioration de ce problème, il serait intéressant de maintenir, voir restaurer la biodiversité microbienne dans les sols agricoles appauvris afin de stimuler l'activité des microorganismes du sol dans le fonctionnement et la qualité des agroécosystèmes (Brussaard et al 2007 ; Mulder et al 2005 ; Supit et al 2012). A terme,

l'objectif serait de pouvoir prédire la réponse des plantes et des microorganismes aux changements globaux pour permettre une meilleure gestion des écosystèmes, en particulier pour les agroécosystèmes qui posent de nombreux problèmes. Ce travail complète et s'ajoute à la multitude de travaux s'inscrivant dans la perspective d'une agriculture durable plus respectueuse de l'environnement, en conservant la qualité nutritionnelle des plantes et en permettant des rendements suffisants pour subvenir aux besoins alimentaires croissants de la population mondiale.

5. Bibliographie

- Achard, F., Eva, H.D., Stibig, H.-J., Mayaux, P., Gallego, J., Richards, T. & Malingreau, J.-P. (2002) Determination of deforestation rates of the world's humid tropical forests. *Science*, 297.
- Ainsworth, E.A. & Rogers, A. (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment*, 30, 258-270.
- Albrechtova, J., Latr, A., Nedorost, L., Pokluda, R., Posta, K. & Vosatka, M. (2012) Dual inoculation with mycorrhizal and saprotrophic fungi applicable in sustainable cultivation improves the yield and nutritive value of onion. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-8.
- Allison, S.D. & Martiny, J.B.H. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11512-11519.
- Altieri, M.A. (2005) The myth of coexistence: why transgenic crops are not compatible with agroecologically based systems of production. *Bulletin of Science, Technology and Society*, 25, 361-371.
- Anderson, I.C. & Cairney, J.W.G. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6, 769-779.
- Arft, A., Walker, M., Gurevitch, J., Alatalo, J., Bret-Harte, M., Dale, M., Diemer, M., et al. (1999) Responses of tundra plants to experimental warming: meta-analysis of the international tundra experiment. *Ecological Monographs*, 69, 491-511.
- Arnold, J.A., Zaller, J.G., Spehn, E.M., Niklaus, P.A., Wells, C.E. & Körner, C. (2000) Dynamics of root systems in native grasslands: effects of elevated atmospheric CO₂. *New Phytologist*, 147, 73-85.
- Asghari, H.R. & Cavagnaro, T.R. (2012) Arbuscular mycorrhizas reduce nitrogen loss via leaching. *Plos One*, 7, e29825.
- Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G.V., Höfte, M., Lemanceau, P. & Cooke, M. (2007) Foreword. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 241-242.
- Bardgett, R.D., Bowman, W.D., Kaufmann, R. & Schmidt, S.K. (2005) Linking aboveground and belowground communities: a temporal approach. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 634-641.

- Barnabás, B., Järger, K. & Fehér, A. (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 31, 11-38.
- Battisti, A., Stastny, M., Netherer, S., Robinet, C., Schopf, A., Roques, A. & Larsson, S. (2005) Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures. *Ecological Applications*, 15, 2084-2096.
- Bazzaz, F.A., Jasienski, M., Thomas, S.C. & Wayne, P. (1995) Microevolutionary responses in experimental populations of plants to CO₂-enriched environments: Parallel results from two model systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 8161-8165.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E. (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89, 353-359.
- Becker, J., Eisenhauer, N., Scheu, S. & Jousset, A. (2012) Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters*, 15, 468-474.
- Bender, C., Alarcon-Chaidez, F. & Gross, D. (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 266-292.
- Bertrand, C. (2004) Les derniers 1000 ans. *Comptes rendus Geoscience*, 336, 741-750.
- Bessler, H., Oelmann, Y., Roscher, C., Buchmann, N., Scherer-Lorenzen, M., Schulze, E.D., Temperton, V.M., et al. (2012) Nitrogen uptake by grassland communities: contribution of N₂ fixation, facilitation, complementarity, and species dominance. *Plant and Soil*, 358, 301-322.
- Bever, J.D., Westover, K.M. & Antonovics, J. (1997) Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal of Ecology*, 85, 561-573.
- Bever, J.D., Richardson, S.C., Lawrence, B.M., Holmes, J. & Watson, M. (2009) Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters*, 12, 13-21.
- Bever, J.D., Platt, T.G. & Morton, E.R. (2012) Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual Review of Microbiology*, 66, 265-283.
- Bezemer, T.M., Fountain, M.T., Barea, J.M., Christensen, S., Dekker, S.C., Duyts, H., van Hal, R., et al. (2010) Divergent composition but similar function of soil food webs of individual plants: plant species and community effects. *Ecology*, 91, 3027-3036.

- Bianciotto, V. & Bonfante, P. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 365-371.
- Boivin, C., Camut, S., Malpica, C.A., Truchet, G. & Rosenberg, C. (1990). *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *The Plant Cell*, 2, 1157-1170.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijfjes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J. & Bloemberg, G.V. (2003) Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 983-993.
- Borer, E.T., Seabloom, E.W. & Tilman, D. (2012) Plant diversity controls arthropod biomass and temporal stability. *Ecology Letters*, 15, 1457-1464.
- Brencic, A. & Winans, S.C. (2005) Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 155-194.
- Brooks, P.D., Williams, M.W. & Schmidt, S.K. (1998) Inorganic nitrogen and microbial biomass dynamics before and during spring snowmelt. *Biogeochemistry*, 43, 1-15.
- Brundrett, M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154, 275-304.
- Brussaard, L., De Ruiter, P.C., & Brown, G.G. (2007) Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 121, 233-244.
- Bunce, J.A. (2008) Contrasting responses of seed yield to elevated carbon dioxide under field conditions within *Phaseolus vulgaris*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 128, 219-224.
- Burdon, J.J., Thrall, P.H. & Ericson, L. (2006) The current and future dynamics of disease in plant communities. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 19-39.
- Callahan, H.S., Maughan, H. & Steiner, U.K. (2008) Phenotypic plasticity, costs of phenotypes, and costs of plasticity: toward an integrative view. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1133, 44-66.
- van Capelle, C., Schrader, S. & Brunotte, J. (2012) Tillage-induced changes in the functional diversity of soil biota – A review with a focus on German data. *European Journal of Soil Biology*, 50, 165-181.

- Cardinale, B.J., Ives, A.R. & Inchausti, P. (2004) Effects of species diversity on the primary productivity of ecosystems: extending our spatial and temporal scales of inference. *Oikos*, 104, 437-450.
- Carney, K.M., Hungate, B.A., Drake, B.G. & Megonigal, J.P. (2007) Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 4990-4995.
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Corell, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N. & Smith, V.H. (1998) Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, 8, 559-568.
- Cash, S.D. & Ditterline, R.L. (1996) Seed size effects on growth and N₂ fixation of juvenile sainfoin. *Field Crops Research*, 46, 145-151.
- Cassman, K.G. (1999) Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5952-5959.
- Chabaud, M., Lichtenzveig, J., Ellwood, S., Pfaff, T. & Journet, P. (2006) Vernalization, crossings and testing for pollen viability. *Medicago truncatula handbook*, 1-13.
- Chapin III, F.S. (1990) The Ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 21, 423-447.
- Chapin III, F.S., Shaver, G.R., Giblin, A.E., Nadelhoffer, K.J. & Laundre, J.A. (1995) Responses of Arctic Tundra to experimental and observed changes in climate. *Ecology*, 76, 694-711.
- Chapin III, F.S., Randerson, J.T., McGuire, A.D., Foley, J.A. & Field, C.B. (2008) Changing feedbacks in the climate-biosphere system. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6, 313-320.
- Chavan, A. & Mukherji, S. (2008) Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: effect of N:P ratio. *Journal of Hazardous Materials*, 154, 63-72.
- Cleland, E.E., Chiariello, N.R., Loarie, S.R., Mooney, H.A. & Field, C.B. (2006) Diverse responses of phenology to global changes in a grassland ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 13740-13744.
- Cooper, C.S., Ditterline, R.L. & Welty, L.E. (1979) Seed size and seeding rate effects upon stand density and yield of alfalfa. *Agronomy Journal*, 71, 83-85.
- Cortois, R. & De Deyn, G.B. (2012) The curse of the black box. *Plant and Soil*, 350, 27-33.

- Crispo, E., Dibattista, J.D., Correa, C., Thibert-planté, X., Mckellar, A.E., Schwartz, A.K., Berner, D., et al. (2010) The evolution of phenotypic plasticity in response to anthropogenic disturbance. *Evolutionary Ecology Research*, 12, 47-66.
- Csima, G., Hernádi, I. & Posta, K. (2012) Effects of pre- and post-transplant inoculation with commercial arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on pelargonium (*Pelargonium hortorum*) and its microorganism community. *Agricultural and Food Science*, 21, 52-61.
- Curtis, T.P., Sloam, W.T. & Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 10494-10499.
- DaMatta, F.M., Grandis, A., Arenque, B.C. & Buckeridge, M.S. (2010) Impacts of climate change on crop physiology and food quality. *Food Research International*, 43, 1814-1823.
- Davidson, A.M., Jennions, M. & Nicotra, A.B. (2011) Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive ? A meta-analysis. *Ecology Letters*, 14, 419-431.
- Decaëns, T. (2010) Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography*, 19, 287-302.
- Delmont, T.O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I.M., Constancias, F., Simonet, P., Hirsch, P. R., et al. (2011) Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1315-1324.
- Denef, K., Bubenheim, H., Lenhart, K., Vermeulen, J., van Cleemput, O., Boeckx, P. & Muller, C. (2007) Community shifts and carbon translocation within metabolically-active rhizosphere microorganisms in grasslands under elevated CO₂. *Biogeosciences*, 4, 769-779.
- Denison, R.F. & Kiers, E.T. (2004a) Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 187-193.
- Denison, R.F. & Kiers, E.T. (2004b) Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic ? *Microbes and Infection*, 6, 1235-1239.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., et al. (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography*, 20, 641-652.

- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., van de Broek, A. & Vanderleyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212, 155-164.
- Doornbos, R.F., Loon, L.C. & Bakker, P.A.H.M. (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 227-243.
- Douglas, A.E. (2008) Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist*, 177, 849-858.
- Drake, B.G., Gonzalez-Meler, M.A. & Long, S.P. (1997) More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂ ? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 609-639.
- Drigo, B., Kowalchuk, G.A. & van Veen, J.A. (2008) Climate change goes underground: effects of elevated atmospheric CO₂ on microbial community structure and activities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 44, 667-679.
- Dunn, R.M., Mikola, J., Bol, R. & Bardgett, R.D. (2006) Influence of microbial activity on plant-microbial competition for organic and inorganic nitrogen. *Plant and Soil*, 289, 321-334.
- Duplessy, J-C. (2001) État des connaissances et incertitudes sur le changement climatique induit par les activités humaines. *Sciences de la Terre et des planètes*, 333, 765-773.
- Dyer, L.A. & Letourneau, D. (2003) Top-down and bottom-up diversity cascades in detrital vs. living food webs. *Ecology Letters*, 6, 60-68.
- Eisenhauer, N., Cesarz, S., Koller, R., Worm, K. & Reich, P.B. (2012) Global change belowground: impacts of elevated CO₂, nitrogen, and summer drought on soil food webs and biodiversity. *Global Change Biology*, 18, 435-447.
- van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., Kristufek, V. & Salles, J.F. (2012) Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 1159-1164.
- Eparvier, A., Lemanceau, P. & Alabouvette, C. (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 177-184.
- Farrand, S.K., van Berkum, P. & Oger, P. (2003) Agrobacterium is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1681-1687.

- Fierer, N., Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Zaneveld, J., Bradford, M.A. & Knight, R. (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal*, 6, 1007-1017.
- Finlay, B.J., Maberly, S.C. & Cooper, J.I. (1997) Microbial Diversity and Ecosystem Function. *Oikos*, 80, 209-213.
- Finzi, A.C., Sinsabaugh, R.L., Long, T.M. & Osgood, M.P. (2006) Microbial community responses to atmospheric carbon dioxide enrichment in a warm-temperate forest. *Ecosystems*, 9, 215-226.
- Flynn, D.F.B., Gogol-Prokurat, M., Nogeire, T., Molinari, N., Richers, B.T., Lin, B.B., Simpson, N., et al. (2009) Loss of functional diversity under land use intensification across multiple taxa. *Ecology Letters*, 12, 22-33.
- Fransen, S.C. & Cooper, C.S. (1976) Seed weight effects upon emergence, leaf development, and growth of sainfoin (*Onobrychis*-spp) seedling. *Crop Science*, 16, 434-437.
- FRB, Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité. (2012) Les valeurs de la biodiversité: un état des lieux de la recherche française.
- Gamfeldt, L., Hillebrand, H. & Jonsson, P.R. (2008) Multiple functions increase the importance of biodiversity for overall ecosystem functioning. *Ecology*, 89, 1223-1231.
- Gans, J., Wolinsky, M. & Dunbar, J. (2005) Computational Improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309.
- Gera Hol, W.H., De Boer, W., Termorshuizen, A.J., Meyer, K.M., Schneider, J.H.M., van Dam, N.M., van Veen, J.A., et al. (2010) Reduction of rare soil microbes modifies plant-herbivore interactions. *Ecology Letters*, 13, 292-301.
- Ghalambor, C.K., McKAY, J.K., Carroll, S.P. & Reznick, D.N. (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, 21, 394-407.
- Ghannoum, O., Caemmerer, S. Von, Ziska, L.H. & Conroy, J.P. (2000) The growth response of C4 plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. *Plant, Cell and Environment*, 23, 931-942.
- Gill, R.A. & Jackson, R.B. (2000) Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytologist*, 147, 13-31.
- Girard, M.C., Walter, C., Rémy, J.C., Berthelin, J. & Morel, J.L. (2005) Sols et Environnement, Chapitre 14. Dunod.
- Goddard, M.R. & Bradford, M.A. (2003) The adaptive response of a natural microbial population to carbon- and nitrogen-limitation. *Ecology Letters*, 6, 594-598.

- Grace, J. & Zhang, R. (2006) Predicting the effect of climate change on global plant productivity and the carbon cycle. In: Plant growth and climate change (Ed. By Morison, J.I.L & Morecroft, M.D.). Blackwell Publishing, Oxford.
- Griffiths, B., Ritz, K., Bardgett, R., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S., et al. (2000) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos*, 90, 279-294.
- Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M. & Neis, U. (2005) Biofloculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 52, 9-18.
- Harker, K.N., Blackshaw, R.E. & Clayton, G.W. (2001) Timing Weed Removal in Field Pea (*Pisum sativum*). *Weed Technology*, 15, 277-283.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004) Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews, Microbiology*, 2, 43-56.
- Hartnett, D.C. & Wilson, W.T. (1999) Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tall grass prairie. *Ecology*, 80, 1187-1195.
- Hawkes, C.V., Wren, I.F., Herman, D.J. & Firestone, M.K. (2005) Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecology Letters*, 8, 976-985.
- He, W.M. & Dong, M. (2003) Plasticity in physiology and growth of *Salix matsudana* in response to simulated atmospheric temperature rise in the Mu Us Sandland. *Photosynthetica*, 41, 297-300.
- He, Z., Piceno, Y., Deng, Y., Xu, M., Lu, Z., Desantis, T., Andersen, G., et al. (2012) The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *The ISME Journal*, 6, 259-272.
- Heath, K.D. & Tiffin, P. (2007) Context dependence in the coevolution of plant and rhizobial mutualists. *The Royal Society*, 274, 1905-1912.
- Hegerl, G.C., Crowley, T.J., Baum, S.K., Kim, K-Y. & Hyde, W.T. (2003) Detection of volcanic, solar and greenhouse gas signals in paleo-reconstructions of Northern Hemispheric temperature. *Geophysical Research Letters*, 30.
- van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., et al. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396.

- van der Heijden, M.G.A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T.R., Rutten, M., van Logtestijn, R. & Staehelin, C. (2006a) Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 178-187.
- van der Heijden, M.G.A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, K., Boller, T., et al. (2006b) The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172, 554-562.
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & van Straalen, N.M. (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296-310.
- Heller, R., Esnault, R. & Lance, C. (1993) *Physiologie végétale. 1.Nutrition.* (5e Ed.). Masson, Paris.
- Hobbie, J. & Hobbie, E. (2006) ¹⁵N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in Arctic tundra. *Ecology*, 87, 816-822.
- Holland, J.N., DeAngelis, D.L. & Schultz, S.T. (2004) Evolutionary stability of mutualism: interspecific population regulation as an evolutionarily stable strategy. *The Royal Society*, 271, 1807-1814.
- Holt, R.D. (2003) On the evolutionary ecology of species' ranges. *Evolutionary Ecology Research*, 5, 159-178.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. & Bohannan, B.J.M. (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6, 613-622.
- Houlton, B.Z., Sigman, D.M. & Hedin, L.O. (2006) Isotopic evidence for large gaseous nitrogen losses from tropical rainforests. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 8745-8750.
- Hueck, C.J. (1998) Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 379-433.
- Hulme, P.E. (2008) Phenotypic plasticity and plant invasions: is it all Jack ? *Functional Ecology*, 22, 3-7.
- Hungate, B.A., Jaeger III, C.H., Gamara, G., Chapin III, F.S. & Field, C.B. (2000) Soil microbiota in two annual grasslands: responses to elevated atmospheric CO₂. *Oecologia*, 124, 589-598.

- Hungate, B.A., Stiling, P.D., Dijkstra, P., Johnson, D.W., Ketterer, M.E., Hymus, G.J., Hinkle, C.R., et al. (2004) CO₂ elicits long-term decline in nitrogen fixation. *Science*, 304.
- Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., & Khalid, A. (2009) Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in Agronomy*, 102, 159-200.
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. (2001) Climate Change: The Scientific Basis. Cambridge University Press, New York.
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. (2007) The Physical Science Basis: Summary for Policymakers. Cambridge University Press, New York.
- Jarvis, P.G. & McNaughton, K.G. (1986) Stomatal control of transpiration: scaling up from leaf to region. In: *Advances in ecological research*, Volume 15. Academic Press, London.
- Johnson, N.C., Wolf, J. & Koch, G.W. (2003) Interactions among mycorrhizae, atmospheric CO₂ and soil N impact plant community composition. *Ecology Letters*, 6, 532-540.
- Johnstone, R.A. & Bshary, R. (2008) Mutualism, market effects and partner control. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 879-888.
- Jones, P.D., New, M., Parker, D.E., Martin, S. & Rigor, I.G. (1999) Surface air temperature and its changes over the past 150 years. *Reviews of Geophysics*, 37, 173-199.
- Kahmen, A., Renker, C., Unsicker, S.B. & Buchmann, N. (2006) Niche complementarity for nitrogen: an explanation for the biodiversity and ecosystem functioning relationship? *Ecology*, 87, 1244-1255.
- Kemen, E. & Jones, J.D.G. (2012) Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles? *Trends in Plant Science*, 17, 448-457.
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. & Stackebrandt, E. (2006) Introduction to the Proteobacteria. In: *The Prokaryotes*, Third edition (Ed. By Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E.). Springer, New York.
- Khan, I.A., Ayub, N., Mirza, S.N., Nizami, S.M. & Azam, M. (2008) Synergistic effect of dual inoculation (vesicular-arbuscular mycorrhizae) on the growth and nutrients uptake of *Medicago Sativa*. *Pakistan Journal of Botany*, 40, 939-945.

- Kihara, J., Martius, C., Bationo, A., Thuita, M., Lesueur, D., Herrmann, L., Amelung, W., et al. (2012) Soil aggregation and total diversity of bacteria and fungi in various tillage systems of sub-humid and semi-arid Kenya. *Applied Soil Ecology*, 58, 12-20.
- Kirschbaum, M.U. (2004) Soil respiration under prolonged soil warming: are rate reductions caused by acclimation or substrate loss ? *Global Change Biology*, 10, 1870-1877.
- Knelman, J.E., Legg, T.M., O'Neill, S.P., Washenberger, C.L., González, A., Cleveland, C. C. & Nemergut, D.R. (2012) Bacterial community structure and function change in association with colonizer plants during early primary succession in a glacier forefield. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 172-180.
- Koellner, T. & Scholz, R.W. (2008) Assessment of land use impacts on the natural environment. Part 2: Generic characterization factors for local species diversity in central Europe. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 13, 32-48.
- Kramer, K. (1995) Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant, Cell and Environment*, 18, 93-104.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J.J. (2004) Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 6-15.
- Kuramae, E.E., Yergeau, E., Wong, L.C., Pijl, A.S., van Veen, J.A. & Kowalchuk, G.A. (2012) Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 12-24.
- Kuzyakov, Y. & Domanski, G. (2000) Carbon input by plants into the soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 421-431.
- Kuzyakov, Y., Hill, P.W. & Jones, D.L. (2007) Root exudate components change litter decomposition in a simulated rhizosphere depending on temperature. *Plant and Soil*, 290, 293-305.
- Landa, B.B., Mavrodi, D.M., Thomashow, L.S. & Weller, D.M. (2003) Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 93, 982-994.
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L. & Read, D. (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1016-1045.

- Lee, T.D., Tjoelker, M.G., Ellsworth, D.S. & Reich, P.B. (2001) Leaf gas exchange responses of 13 prairie grassland species to elevated CO₂ and increased nitrogen supply. *New Phytologist*, 150, 405-418.
- Leigh, J., Fitter, A.H. & Hodge, A. (2011) Growth and symbiotic effectiveness of an arbuscular mycorrhizal fungus in organic matter in competition with soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 76, 428-438.
- Lemanceau, P. (1992) Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*, 12, 413-437.
- Lesaulnier, C., Papamichail, D., McCorkle, S., Ollivier, B., Skiena, S., Taghavi, S., Zak, D., et al. (2008) Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. *Environmental Microbiology*, 10, 926-441.
- Liang, C., Jesus, E.D.C., Duncan, D.S., Jackson, R.D., Tiedje, J.M. & Balser, T.C. (2012) Soil microbial communities under model biofuel cropping systems in southern Wisconsin, USA: Impact of crop species and soil properties. *Applied Soil Ecology*, 54, 24-31.
- Liao, C., Peng, R., Luo, Y., Zhou, X., Wu, X., Fang, C., Chen, J., et al. (2008) Altered ecosystem carbon and nitrogen cycles by plant invasion: A meta-analysis. *New Phytologist*, 177, 706-714.
- Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Horton, T.R. & Lovett, G.M. (2002) Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology*, 83, 104-115.
- Llorens, L., Peñuelas, J., Estiarte, M. & Bruna, P. (2004a) Contrasting growth changes in two dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to experimental drought and warming. *Annals of Botany*, 94, 843-853.
- Llorens, L., Peñuelas, J., Beier, C., Emmett, B., Estiarte, M. & Tietema, A. (2004b) Effects of an experimental increase of temperature and drought on the photosynthetic performance of two ericaceous shrub species along a north-south European gradient. *Ecosystems*, 7, 613-624.
- Lloyd, A.H. & Fastie, C.L. (2002) Spatial and temporal variability in the growth and climate response of treeline trees in Alaska. *Climatic Change*, 52, 481-509.
- Logan, J.A., Régnière, J. & Powell, J.A. (2003) Assessing the impacts of global warming on forest pest dynamics. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1, 130-137.

- Loik, M.E., Redar, S.P. & Harte, J. (2000) Photosynthetic responses to a climate-warming manipulation for contrasting meadow species in the Rocky Mountains, Colorado, USA. *Functional Ecology*, 14, 166-175.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
- Loreau, M. (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos*, 91, 3-17.
- Loreau, M. (2001a) Microbial diversity, producer-decomposer interactions and ecosystem processes: a theoretical model. *The Royal Society*, 268, 303-309.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J.P., Hector, A., Hooper, D.U., et al. (2001b) Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*, 294, 804-808.
- Luo, Y., Sims, D.A. & Griffin, K.L. (1998) Nonlinearity of photosynthetic responses to growth in rising atmospheric CO₂: an experimental and modelling study. *Global Change Biology*, 4, 173-183.
- Luo, Y., Su, B., Currie, W.S., Dukes, J.S., Finzi, A., Hartwig, U., Hungate, B., et al. (2004) Progressive nitrogen limitation of ecosystem responses to rising atmospheric carbon dioxide. *BioScience*, 54.
- Luo, Y., Hui, D. & Zhang, D. (2006) Elevated CO₂ stimulates net accumulations of carbon and nitrogen in land ecosystems: a meta-analysis. *Ecology*, 87, 53-63.
- Luo, Y. (2007) Terrestrial carbon-cycle feedback to climate warming. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 683-712.
- Lynch, J.M. (1983) Soil Biotechnology - Microbiological factors in crop productivity. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lynch, J.M. & Whipps, J.M. (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129, 1-10.
- MacArthur, R.H. & Wilson, E.O. (1967) The theory of island biogeography. Princeton University Press, New Jersey, USA.
- Mapelli, F., Marasco, R., Rizzi, A., Baldi, F., Ventura, S., Daffonchio, D. & Borin, S. (2011) Bacterial communities involved in soil formation and plant establishment triggered by pyrite bioweathering on arctic moraines. *Microbial Ecology*, 61, 438-447.
- Matesanz, S., Gianoli, E. & Valladares, F. (2010) Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206, 35-55.

- MEA, Millennium Ecosystem Assessment. (2005a) Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC.
- MEA, Millennium Ecosystem Assessment. (2005b) Cultivated Systems. In: Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends. Island Press, Washington, DC.
- Menzel, A. (2000) Trends in phenological phases in Europe between 1951 and 1996. *International Journal of Biometeorology*, 44, 76-81.
- Menzel, A., Jakobi, G., Ahas, R., Scheifinger, H. & Estrella, N. (2003) Variations of the climatological growing season (1951-2000) in Germany compared to other countries. *International Journal of Climatology*, 23, 793-812.
- Menzel, A., Sparks, T.H., Estrella, N., Koch, E., Aasa, A., Ahas, R., Alm-Kübler, K., et al. (2006) European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biology*, 12, 1969-1976.
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D. & White, P.J. (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1729-1739.
- Morison, J.I.L. & Lawlor, D.W. (1999) Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell and Environment*, 22, 659-682.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C. & Lemanceau, P. (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist*, 170, 165-175.
- Mulder, C., Cohen, J.E., Setälä, H., Bloem, J. & Breure, A.M. (2005) Bacterial traits, organism mass, and numerical abundance in the detrital soil food web of Dutch agricultural grasslands. *Ecology Letters*, 8, 80-90.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G. & Renella, G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- Nelson, G.C. (2005a) Drivers of Change in Ecosystem Condition and Services. In: Ecosystems and human well-being, Volume 1: current state and trends. Island Press, Chapter 7, 175-214.
- Nelson, G.C. (2005b) Drivers of Ecosystem Change: Summary Chapter. In: Ecosystems and human well-being, Volume 1: current state and trends. Island Press, Chapter 3, 73-76.
- Newton, A.C., Fitt, B.D.L., Atkins, S.D., Walters, D.R. & Daniell, T.J. (2010) Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology*, 18, 365-373.

- Nguyen, C. (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23, 375-396.
- Nicotra, A.B., Atkin, O.K., Bonser, S.P., Davidson, A.M., Finnegan, E.J., Mathesius, U., Poot, P., et al. (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, 15, 684-692.
- Nielsen, U.N., Ayres, E., Wall, D.H. & Bardgett, R.D. (2011) Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *European Journal of Soil Science*, 62, 105-116.
- Norby, R.J. & Jackson, R.B. (2000) Root dynamics and global change: seeking an ecosystem perspective. *New Phytologist*, 147, 3-12.
- Nunes, C., De Sousa Araújo, S., Da Silva, J.M., Fevèreiro, M.P.S. & Da Silva, A.B. (2008) Physiological responses of the legume model *Medicago truncatula* cv. Jemalong to water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 289-296.
- Olesniewicz, K.S. & Thomas, R.B. (1999) Effects of mycorrhizal colonization on biomass production and nitrogen fixation of black locust (*Robinia pseudoacacia*) seedlings grown under elevated atmospheric carbon dioxide. *New Phytologist*, 142, 133-140.
- Oren, R., Ellsworth, D.S., Johnsen, K.H., Phillips, N., Ewers, B.E., Maier, C., Schäfer, K.V.R., et al. (2001) Soil fertility limits carbon sequestration by forest ecosystems in a CO₂-enriched atmosphere. *Nature*, 411.
- Parmesan, C. (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 637-669.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 207-220.
- Peh, K.S.H. & Lewis, S.L. (2012) Conservation implications of recent advances in biodiversity–functioning research. *Biological Conservation*, 151, 26-31.
- Philippot, L., Hallin, S. & Schlöter, M. (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy*, 96, 249-305.
- Phillips, R.L., Zak, D.R., Holmes, W.E. & White, D.C. (2002) Microbial community composition and function beneath temperate trees exposed to elevated atmospheric carbon dioxide and ozone. *Oecologia*, 131, 236-244.
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougél, C., Lemanceau, P. & Berta, G. (2009) Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19, 81-90.

- Post, W.M. & Kwon, K.C. (2000) Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. *Global Change Biology*, 6, 317-327.
- Postma-Blaauw, M.B., De Goede, R.G.M., Bloem, J., Faber, J.H. & Brussaard, L. (2012) Agricultural intensification and de-intensification differentially affect taxonomic diversity of predatory mites, earthworms, enchytraeids, nematodes and bacteria. *Applied Soil Ecology*, 57, 39-49.
- Prieto, P., Peñuelas, J., Ogaya, R. & Estiarte, M. (2008) Precipitation-dependent flowering of *Globularia alypum* and *Erica multiflora* in mediterranean shrubland under experimental drought and warming, and its inter-annual variability. *Annals of Botany*, 102, 275-285.
- Pritchard, S., Rogers, H., Prior, S. & Peterson, C. (1999) Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Global Change Biology*, 5, 807-837.
- van der Putten, W.H. (2003) Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation. *Ecology*, 84, 2269-2280.
- van der Putten, W.H., De Ruiter, P.C., Martijn Bezemer, T., Harvey, J.A., Wassen, M. & Wolters, V. (2004) Trophic interactions in a changing world. *Basic and Applied Ecology*, 5, 487-494.
- van der Putten, W.H., Macel, M. & Visser, M.E. (2010) Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 2025-2034.
- Raynaud, X., Lata, J.C. & Leadley, P.W. (2006) Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant-microbial interactions. *Plant and Soil*, 287, 95-116.
- Reich, P.B., Hungate, B.A. & Luo, Y. (2006) Carbon-nitrogen interactions in terrestrial ecosystems in response to rising atmospheric carbon dioxide. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 611-36.
- Reznick, D., Bryant, M.J. & Bashey, F. (2002) r- and K-selection revisited: the role of population regulation in life-history evolution. *Ecology*, 83, 1509-1520.
- Rimer, R.L. & Evans, R.D. (2006) Invasion of downy brome (*Bromus tectorum* L.) causes rapid changes in the nitrogen cycle. *The American Midland Naturalist*, 156, 252,258.
- Rogers, H.H., Prior, S.A., Runion, G.B. & Mitchell, R.J. (1996) Root to shoot ratio of crops as influenced by CO₂. *Plant and Soil*, 187, 229-248.

- Rogers, A., Gibon, Y., Stitt, M., Morgan, P.B., Bernacchi, C.J., Ort, D.R. & Long, S.P. (2006) Increased C availability at elevated carbon dioxide concentration improves N assimilation in a legume. *Plant, Cell and Environment*, 29, 1651-1658.
- Rosswall, T. (1976) The internal nitrogen cycle between microorganisms, vegetation and soil. *Ecological Bulletins*, 22, 157-167.
- Rudgers, J.A. & Clay, K. (2008) An invasive plant–fungal mutualism reduces arthropod diversity. *Ecology Letters*, 11, 831-840.
- Rustad, L.E., Campbell, J.L., Marion, G.M., Norby, R.J., Mitchell, M.J., Hartley, A.E., Cornelissen, J.H.C., et al. (2001) A meta-analysis of the response of soil respiration, net nitrogen mineralization, and aboveground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia*, 126, 543-562.
- Ryabov, A.B. & Blasius, B. (2011) A graphical theory of competition on spatial resource gradients. *Ecology Letters*, 14, 220-228.
- Sardans, J., Rivas-Ubach, A. & Peñuelas, J. (2012) The C:N:P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: A review and perspectives. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14, 33-47.
- Scheublin, T.R., van Logtestijn, R.S.P. & van Der Heijden, M.G.A. (2007) Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *Journal of Ecology*, 95, 631-638.
- Schlichting, C. (2002) Phenotypic plasticity in plants. *Plant Species Biology*, 17, 85-88.
- Schmera, D., Baur, B. & Erős, T. (2012) Does functional redundancy of communities provide insurance against human disturbances ? An analysis using regional-scale stream invertebrate data. *Hydrobiologia*, 693, 183-194.
- Schulz, S., Giebler, J., Chatzinotas, A., Wick, L.Y., Fetzer, I., Welzl, G., Harms, H., et al. (2012) Plant litter and soil type drive abundance, activity and community structure of alkB harbouring microbes in different soil compartments. *The ISME Journal*, 6, 1763-1774.
- Schutter, M.E., Sandeno, J.M. & Dick, R.P. (2001) Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 34, 397-410.
- Sherry, R.A., Zhou, X., Gu, S., Arnone III, J.A., Schimel, D.S., Verburg, P.S., Wallace, L.L., et al. (2007) Divergence of reproductive phenology under climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 198-202.

- Six, J., Frey, S.D., Thiet, R.K. & Batten, K.M. (2006) Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 70, 555-569.
- Snell-Rood, E.C., van Dyken, J.D., Cruickshank, T., Wade, M.J. & Moczek, A.P. (2010) Toward a population genetic framework of developmental evolution: the costs, limits, and consequences of phenotypic plasticity. *BioEssays*, 32, 71-81.
- Springer, C.J. & Ward, J.K. (2007) Flowering time and elevated atmospheric CO₂. *New Phytologist*, 176, 243-255.
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 487-506.
- Stegen, J.C., Enquist, B.J. & Ferrière, R. (2012) Eco-Evolutionary Community Dynamics: Covariation between Diversity and Invasibility across Temperature Gradients. *The American Naturalist*, 180, 110-126
- Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K. & Naidu, R. (2011) Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 29, 896-907.
- Supit, I., van Diepen, C.A., De Wit, A.J.W., Wolf, J., Kabat, P., Baruth, B. & Ludwig, F. (2012) Assessing climate change effects on European crop yields using the Crop Growth Monitoring System and a weather generator. *Agricultural and Forest Meteorology*, 164, 96-111.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010) Chapter 12: Assimilation of mineral nutrients. In: Plant Physiology, Fifth Edition. *Sinauer Associates Publishers*, Sunderland, UK.
- Tarnawski, S., Hamelin, J., Jossi, M., Aragno, M. & Fromin, N. (2006) Phenotypic structure of *Pseudomonas* populations is altered under elevated pCO₂ in the rhizosphere of perennial grasses. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1193-1201.
- Temperton, V.M., Grayston, S.J., Jackson, G., Barton, C.V.M., Millard, P. & Jarvis, P.G. (2003) Effects of elevated carbon dioxide concentration on growth and nitrogen fixation in *Alnus glutinosa* in a long-term field experiment. *Tree Physiology*, 23, 1051-1059.
- Thibert-Plante, X. & Hendry, A.P. (2011) The consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 326-342.
- Thompson, J.N. (2001) Coevolution. *Nature*, 1-5.

- Thrall, P.H., Hochberg, M.E., Burdon, J.J. & Bever, J.D. (2007) Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 120-126.
- Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., et al. (2001a) Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292.
- Tilman, D., Reich, P.B., Knops, J., Wedin, D., Mielke, T. & Lehman, C. (2001b) Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science*, 294.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. & Polasky, S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418.
- Treseder, K.K. (2004) A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist*, 164, 347-355.
- Tylianakis, J.M., Didham, R.K., Bascompte, J. & Wardle, D.A. (2008) Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 1351-1363.
- Valladares, F., Gianoli, E. & Gómez, J.M. (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, 176, 749-763.
- Verbruggen, E., van der Heijden, M.G.A., Rillig, M.C. & Kiers, E.T. (2012) Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytologist*, 1-6.
- Veresoglou, S.D., Chen, B. & Rillig, M.C. (2012) Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 53-62.
- Visscher, H., Sephton, M.A. & Looy, C.V. (2011) Fungal virulence at the time of the end-Permian biosphere crisis ? *Geology*, 39, 883-886.
- Vitousek, P.M. (1994) Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology*, 75, 1861-1876.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J. & Melillo, J. (1997a) Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277.
- Vogelsang, K.M., Reynolds, H.L. & Bever, J.D. (2006) Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist*, 172, 554-562.
- Vriezen, J.A.C., De Bruijn, F.J. & Nüsslein, K. (2007) Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3451-3459.

- Wagner, J., Luscher, A., Hillebrand, C., Kobald, B., Spitaler, N. & Larcher, W. (2001) Sexual reproduction of *Lolium perenne* L. and *Trifolium repens* L. under free air CO₂ enrichment (FACE) at two levels of nitrogen application. *Plant, Cell and Environment*, 24, 957-965.
- Walther, G.R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J-M., et al. (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., van der Putten, W.H. & Wall, D.H. (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Callaway, R.M. & van der Putten, W.H. (2011) Terrestrial ecosystem responses to species gains and losses. *Science*, 332, 1273-1277.
- Weigel, H.J. & Manderscheid, R. (2012) Crop growth responses to free air CO₂ enrichment and nitrogen fertilization: Rotating barley, ryegrass, sugar beet and wheat. *European Journal of Agronomy*, 43, 97-107.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Freitag, T., Guillaumaud, N., et al. (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8, 2162-2169.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N. & Le Roux, X. (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology*, 9, 2211-2219.
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487-511.
- Whipps, J.M. (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1198-1227.
- Williams, M.A., Rice, C.W. & Owensby, C.E. (2000) Carbon dynamics and microbial activity in tallgrass prairie exposed to elevated CO₂ for 8 years. *Plant and Soil*, 227, 127-137.
- Wilson, M. & Lindow, S.E. (1993) Effect of phenotypic plasticity on epiphytic survival and colonization by *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 410-416.
- Wilson, G.W. & Hartnett, D.C. (1998) Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany*, 85, 1732-1738.

- Woodward, F.I. (2002) Potential impacts of global elevated CO₂ concentrations on plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 207-211.
- Woodward, F.I. (2008) Plant waterworld. *New Phytologist*, 180, 557-559.
- Wu, C.H., Bernard, S.M., Andersen, G.L. & Chen, W. (2009) Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial Biotechnology*, 2, 428-440.
- Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J. & van der Lelie, D. (2011) Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 299-323.
- Yacobucci, B.D. & Schnepf, R. (2007) Ethanol and Biofuels: Agriculture, Infrastructure, and Market Constraints Related to Expanded Production. *Congressional Research Service Report for Congress*.
- Young, N.D., Mudge, J. & Ellis, T.N. (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 199-204.
- Yu, L., Nicolaisen, M., Larsen, J. & Ravnkov, S. (2012) Succession of root-associated fungi in *Pisum sativum* during a plant growth cycle as examined by 454 pyrosequencing. *Plant and Soil*, 358, 225-233.
- Yuan, H., Ge, T., Chen, C., O'Donnell, A.G. & Wu, J. (2012) Significant role for microbial autotrophy in the sequestration of soil carbon. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2328-2336.
- Zak, D.R., Pregitzer, K.S., King, J.S. & Holmes, W.E. (2000) Elevated atmospheric CO₂, fine roots and the response of soil microorganisms: a review and hypothesis. *New Phytologist*, 147, 201-222.
- Zak, D.R., Holmes, W.E., White, D.C., Peacock, A.D. & Tilman, D. (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links ? *Ecology*, 84, 2042-2050.
- Zhou, X., Liu, X., Wallace, L.L. & Luo, Y. (2007) Photosynthetic and respiratory acclimation to experimental warming for four species in a Tallgrass Prairie Ecosystem. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 270-281.
- Ziska, L.H. & Bunce, J.A. (1997) Influence of increasing carbon dioxide concentration on the photosynthetic and growth stimulation of selected C₄ crops and weeds. *Photosynthesis Research*, 54, 199-208.

- Ziska, L.H. (1998) The influence of root zone temperature on photosynthetic acclimation to elevated carbon dioxide concentrations. *Annals of Botany*, 81, 717-721.
- Ziska, L.H. & Bunce, J.A. (1998) The influence of increasing growth temperature and CO₂ concentration on the ratio of respiration to photosynthesis in soybean seedlings. *Global Change Biology*, 4, 637-643.
- Ziska, L.H. & Bunce, J.A. (2006) Plant responses to rising atmospheric carbon dioxide. In: Plant growth and climate change (Ed. By Morison, J.I.L. & Morecroft, M.D.). Blackwell Publishing, Oxford.
- Zvereva, E.L. & Kozlov, M.V. (2006) Consequences of simultaneous elevation of carbon dioxide and temperature for plant-herbivore interactions: a metaanalysis. *Global Change Biology*, 12, 27-41.

Conclusion du cadre scientifique du projet de thèse

Cette synthèse bibliographique a permis de mettre en avant l'intérêt d'étudier les interactions entre plantes et microorganismes du sol. Or, la plupart des études concernant ces interactions ont une vision compartimentée et s'intéressent plus ou moins précisément à la plante et/ou aux microorganismes ou encore à l'effet de l'un sur l'autre. L'originalité du travail de thèse présenté ici est le fait d'étudier le lien qui existe entre les deux partenaires. Cette thèse a donc pour but de tester ce lien en le soumettant à diverses modifications environnementales. De plus, on observe l'effet d'un partenaire sur l'autre mais également la réciproque avec des aspects coûts-bénéfices. Cela nous permet, au-delà de la constatation des effets d'un compartiment sur l'autre suite à une modification environnementale, de comprendre comment fonctionnent ces interactions et les causes à l'intérieur de chaque compartiment qui entraîne les effets observés sur l'autre compartiment (Figure 0.8). En outre, l'étude de ces interactions se fait par le passage d'une seule souche microbienne à une communauté microbienne dans son ensemble.

Dans cet objectif, plusieurs variations environnementales ont été appliquées en jouant sur l'un ou l'autre des compartiments:

- Augmentation en CO₂ atmosphérique apporté à la plante
- Dilution de la diversité microbienne rhizosphérique

De plus, le lien entre les compartiments végétal et microbien a été observé et décrypté suite au marquage isotopique du CO₂ fourni à la plante (¹³C) et au suivi de cet élément marqué de la plante jusqu'à la communauté microbienne rhizosphérique.

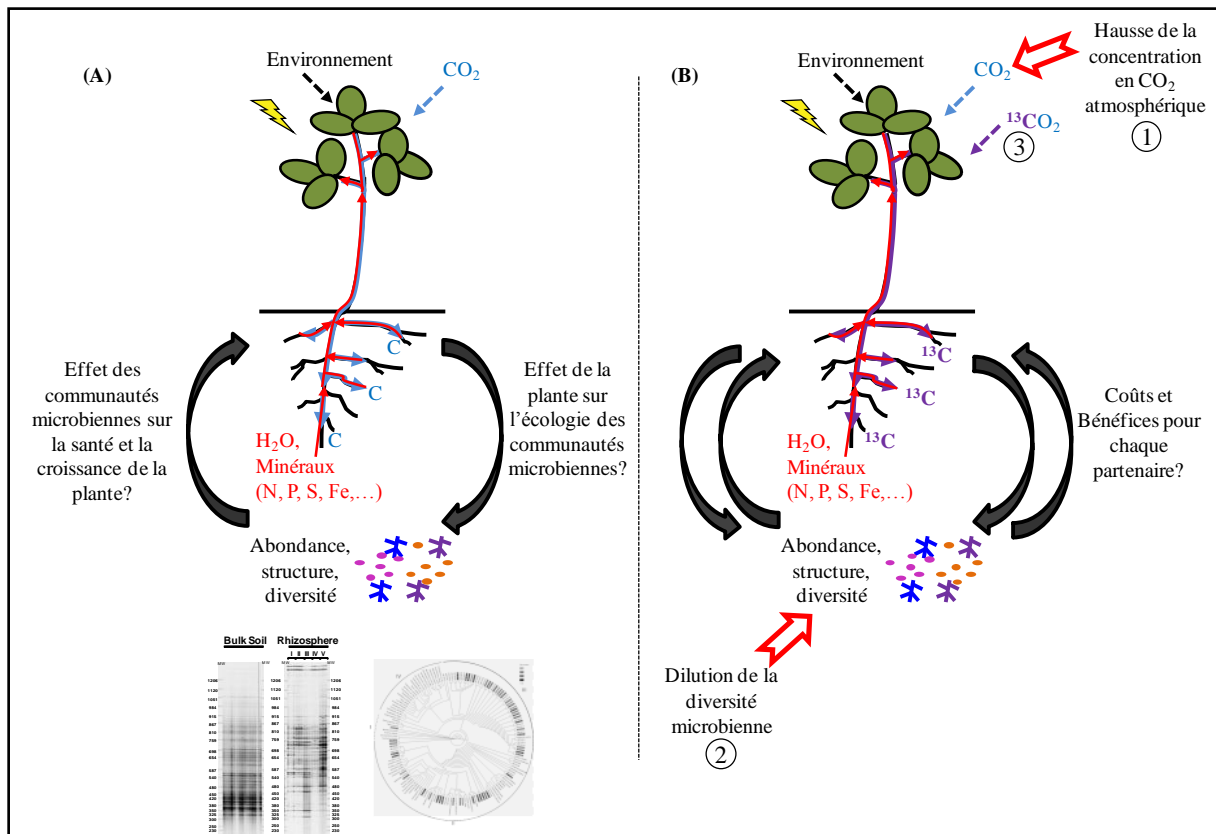


Figure 0.8 Présentation schématique (A) des études courantes réalisées au niveau des interactions plantes-microorganismes et (B) du nouvel angle d'étude de ces interactions constituant ce travail de thèse. (A) Le CO_2 capté par la plante est intégré dans sa biomasse, suite à la photosynthèse, puis dirigé vers les racines et une partie est libérée dans le sol et disponible pour les microorganismes de la rhizosphère. Les plantes vont avoir un effet sur l'écologie des communautés microbiennes en jouant notamment sur l'abondance, la structure et la diversité de ces communautés. En retour, les microorganismes, quand ils interagissent positivement avec la plante, facilitent sa captation de l'eau et des éléments minéraux (N , P , S , Fe , ...) et vont impacter sur la santé et la croissance des plantes. L'approche couramment empruntée, pour l'étude de ces interactions, est l'effet d'un compartiment sur l'autre. (B) En revanche, ce travail de thèse s'intéresse à l'effet de chacun des compartiments sur l'autre en condition de variation environnementale ((1) Hausse du CO_2 atmosphérique et (2) dilution de la diversité microbienne) avec une vision coûts-bénéfices pour chaque compartiment. Le lien trophique entre les deux compartiments est ensuite précisé par (3) le suivi du trajet de l'élément ^{13}C fourni à la plante.

CHAPITRE I

**Interaction entre *Medicago truncatula* et *Pseudomonas fluorescens*:
Evaluation des coûts et bénéfices suite à une hausse de la concentration en
CO₂ atmosphérique**

CHAPITRE I

Interaction entre *Medicago truncatula* et *Pseudomonas fluorescens*: Evaluation des coûts et bénéfices suite à une hausse de la concentration en CO₂ atmosphérique

Préambule

La synthèse bibliographique souligne l'intérêt de mieux comprendre le fonctionnement des interactions plantes-microbes afin d'assurer leur maintien. L'objectif de ce premier chapitre est donc de se placer dans un cadre simplifié où un génotype de plante interagit avec un génotype microbien afin de mettre en évidence les coûts et bénéfices pour chaque partenaire au sein de l'interaction. Pour cela, des pots spécialement conçus pour une culture gnotobiotique (microbiologiquement contrôlée) ont été utilisés. L'interaction étudiée a lieu entre une légumineuse, *Medicago truncatula*, qui a un intérêt en agroécologie (Thoquet et al 2002), et la bactérie mutualiste, *Pseudomonas fluorescens* (Lemanceau 1992). Afin de mettre en évidence les coûts et bénéfices de l'interaction (Morgan et al 2005), la concentration en CO₂ atmosphérique apporté à la plante a été augmentée. Pour visualiser les coûts et bénéfices pour chacun, différents traits fonctionnels ont été mesurés. Concernant la plante, on a mesuré des traits fonctionnels liés à la croissance, au développement et à la reproduction. Le trait mesuré pour le partenaire microbien est sa densité. Cette expérience nous permettra de voir comment va réagir une telle interaction suite à un des paramètres du changement global, la hausse du CO₂ (IPCC 2001). Cet élément étant déterminant dans la boucle d'interaction qui relie les deux partenaires (Nielsen et al 2011), on peut supposer que la hausse du CO₂ entraîne un taux photosynthétique plus important (Luo et al 2006) et donc une production accrue de rhizodépôts (Drigo et al 2008 ; Finzi et al 2006) permettant une stimulation positive de la croissance bactérienne (Eisenhauer et al 2012 ; Williams et al 2000). Ce phénomène pouvant conduire à un renforcement de l'interaction mutualiste *Medicago truncatula*-*Pseudomonas fluorescens*. Cette étude permettra de répondre aux questions suivantes :

- Quel rôle joue la bactérie *P. fluorescens* dans la réponse a priori positive de *M. truncatula* suite à une hausse du CO₂ ?
- La densité bactérienne est-elle affectée par une plus forte disponibilité en composés carbonés fournis par la plante ?
- Y a-t-il un changement de l'association mutualiste ?

Ce chapitre a été publié sous forme d'un **article dans le journal PlosOne** qui s'intitule «Interaction between *Medicago truncatula* and *Pseudomonas fluorescens*: Evaluation of Costs and Benefits across an Elevated Atmospheric CO₂.» (doi:10.1371/journal.pone.0045740).

Sommaire

ABSTRACT	94
INTRODUCTION.....	95
MATERIALS AND METHODS	97
Experimental design	97
Medicago truncatula growth conditions	97
Preparation of <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain C7R12 inoculums.....	98
Quantification of plant traits	98
Quantification of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 density and gnotobiotic conditions assessment	99
Statistical analysis	99
RESULTS.....	101
CO ₂ and <i>P. fluorescens</i> C7R12 effect on vegetative growth and development of <i>M.</i> <i>truncatula</i>	101
CO ₂ and <i>P. fluorescens</i> C7R12 effect on reproductive traits of <i>M. truncatula</i>	106
CO ₂ effect on <i>P. fluorescens</i> C7R12 fitness	111
DISCUSSION	113
CO ₂ enrichment and <i>P. fluorescens</i> C7R12 interact positively on <i>M. truncatula</i> development and growth	113
Interaction between CO ₂ and <i>P. fluorescens</i> C7R12 on reproductive traits of <i>M.</i> <i>truncatula</i>	113
CO ₂ and <i>M. truncatula</i> effect on <i>P. fluorescens</i> C7R12	114
Changes in the cost/benefit balance due to increase in atmospheric CO ₂	115
ACKNOWLEDGEMENTS.....	116
REFERENCES.....	117
SUPPORTING INFORMATION.....	121

Interaction between *Medicago truncatula* and *Pseudomonas fluorescens*: Evaluation of costs and benefits across an elevated atmospheric CO₂

Clémentine Lepinay¹, Thierry Rigaud², Christophe Salon¹, Philippe Lemanceau¹, Christophe Mougel^{1*}

¹ INRA, UMR 1347 Agroécologie, 17 rue Sully BP 86510, F-21065 Dijon Cedex, France,

² CNRS, UMR CNRS / Université de Bourgogne 6282 Biogeosciences, 6 bd Gabriel, F-21000 Dijon, France.

* E-mail: christophe.mougel@dijon.inra.fr

Doi:10.1371/journal.pone.0045740

Abstract

Soil microorganisms play a key role in both plants nutrition and health. Their relation with plant varies from mutualism to parasitism, according to the balance of costs and benefits for the two partners of the interaction. These interactions involved the liberation of plant organic compounds via rhizodeposition. Modification of atmospheric CO₂ concentration may affect rhizodeposition and as a consequence trophic interactions that bind plants and microorganisms. Positive effect of elevated CO₂ on plants are rather well known but consequences for microorganisms and their interactions with plants are still poorly understood.

A gnotobiotic system has been developed to study the interaction between *Medicago truncatula* Jemalong J5 and the mutualistic bacteria *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 under two atmospheric CO₂ concentrations: ambient (365 ppm) versus enriched (750 ppm). Costs and benefits for each partner have been determined over time by measuring plant development and growth, the C and N contents of the various plant parts and the density of the bacteria in rhizosphere compartments. Following the increase in CO₂, there was a beneficial effect of *P. fluorescens* C7R12 on development, vegetative growth, and C/N content of *M. truncatula*. Concerning plant reproduction, an early seed production was noticed in presence of the bacterial strain combined with increased atmospheric CO₂ conditions. Paradoxically, this transient increase in seed production was correlated with a decrease in bacterial density in the rhizosphere soil, revealing a cost of increased CO₂ for the bacterial strain. This shift of costs-benefits ratio disappeared later during the plant growth.

In conclusion, the increase in CO₂ concentration modifies transiently the cost-benefit balance in favor of the plant. These results may be explained either by a competition between the two partners or a change in bacterial physiology. The ecosystem functioning depends on the stability of many plant-microbe associations that abiotic factors can disrupt.

Keywords: CO₂ enrichment, gnotobiotic culture, metabolic cost and benefit, mutualism, plant fitness, plant-microorganism interactions, rhizosphere

Introduction

The interactions between plants and soil microorganisms are mainly based on trophic relationships [1]. In mutualistic interactions, the plant supplies to microbes carbon compounds, which drive both development of microbial population and their activities [2,3]. In exchange, microbes provide the plant with inorganic and/or organic compounds necessary to its growth [4]. The compounds are costly to produce for each partner but these costs are balanced by the benefits. This subtle cost-benefit balance results from a co-evolution between the two organisms [5-8]. However, the present stability of such interactions often masks a conflict of interest between the two partners. It has been shown that some associations may be mutualistic or antagonistic according to variations in the proximate environment, biotic or abiotic, of the partners (e.g. [9]). How modulation of environmental factors can affect the nature of the association (mutualistic or parasitic) remains overlooked in the case of interactions between plants and soil microorganisms. Some studies showed that changes in atmospheric carbon dioxide (CO₂) induce differential competition for other elements between plants and microorganisms [10-13], but a potential shift in the balance of costs-benefits between the partners of the association has never been investigated.

Plant-microbe association in the rhizosphere (the area of soil around roots which is strongly influenced by the metabolism of the plant) is hugely dependent on the plant photosynthetic rate, which determines the amount of rhizodeposits potentially used by microorganisms [14]. The photosynthetic rate is itself determined by abiotic factors, such as availability of soil water and soil mineral elements [15] mainly nitrogen [16], and above all the atmospheric CO₂. Modulating the plant carbon budget through a variation of the atmospheric CO₂ concentration is a valuable approach to go further in the understanding of plant-microbe interactions in the rhizosphere. The effects of elevated atmospheric CO₂ on plants are rather well known, increasing their overall fitness [16-18]. However, the responses of microbial component to elevated CO₂ are still poorly understood. Some studies highlighted changes in physiology and composition of microbial communities [19] or in a bigger bacterial density because of the increase in the carrying capacity of the rhizosphere environment due to the larger amount of rhizodeposits [20]. Up to now, the feedback effect on the plant has never been investigated.

Medicago truncatula is a model plant for legumes [21-24], mainly because of its symbiotic associations with rhizobia [4,25], its large synteny with several legumes [26], its small genome size [27] and the availability of genetic and genomic resources. Moreover, *M.*

truncatula interacts with various telluric microbes including plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) such as *Pseudomonas fluorescens* [28]. Among them, *P. fluorescens* strain C7R12, a mutant resistant to rifampicin [29] of a strain isolated from a soil naturally suppressive to a major soilborne disease [30], was shown to promote growth and mycorrhization of *M. truncatula* [31], and to efficiently colonize the rhizosphere and the root tissues of this plant species [32,33]. Here, the interaction between *M. truncatula* and the mutualist bacteria, *P. fluorescens* C7R12, was studied using a gnotobiotic system specifically developed for this purpose. In order to investigate the sole effect of *P. fluorescens*, *M. truncatula* was grown in gnotobiotic conditions in the absence of resident symbionts. More precisely, the dynamic of costs and benefits for *M. truncatula* and the *P. fluorescens* C7R12 was characterized during their interaction from vegetative to reproductive stages and this work allowed to answer the following questions: (i) How bacterial presence impacts *a priori* the positive effect of elevated CO₂ concentrations on plant trait?; (ii) Due to an increased carbon availability, does this effect lead to alterations in bacterial density? and (iii) do we observe any change in the mutualistic association?

Materials and Methods

Experimental design

Two experimental replicates were performed successively at different times in the same controlled conditions. The two experiments were carried out with two interacting treatments: bacteria (substrate being inoculated or not with bacteria) and CO₂ concentration (plant grown under ambient (365 ppm) or elevated (750 ppm) atmospheric CO₂ concentration). Five replicates were used for each treatment combination. Under each condition, plant development was characterized three times during the growth cycle: during the vegetative period (V, 29 days post-sowing), during flowering, at the beginning of pods maturation (Fp, 43 days post-sowing) and during a later stage of reproduction, where some flowers were still present but most of pods were maturing on plants (Pf, 63 days post-sowing). This resulted in 2 experimental replicates x 4 treatments (inoculated *versus* no-inoculated and ambient *versus* elevated CO₂) x 3 stages investigated (V, Fp and Pf) x 5 replicates (pots), equalling 120 pots in total.

Medicago truncatula growth conditions

Seeds of *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5 were selected for homogeneous weight (between 4.5 and 5 mg) in order to homogenize germination. Seeds were scarified, surface sterilized, pre-germinated [34] and vernalized by a passage at 4 °C for 10 days to accelerate the beginning of flowering [35]. Before being sown, seeds were placed at 20 °C for 24 h in the dark.

Seeds were sown in stainless steel pots containing a substrate composed of attapulgitite and expanded clay mixed in proportion 1 / 1 (v / v). The pots were specifically developed in order to allow plant growth and maintain gnotobiotic conditions (see supporting information, Figure S1). They were sterilized together with substrate using gamma rays (internal dose of 45 kGy) (IONISOS, Meylan, France) before seeds were sown. All the pots were watered with 50 ml of nutrient solution at 10 milliequivalents of nitrogen (mM N) and composed of filtered (0.2 µm) stock solutions with the following ion composition: KNO₃ ($2.02 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$), K₂HPO₄ ($7.92 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$), Ca(NO₂)₂ + 4H₂O ($3 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$), MgSO₄ ($1.2 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$), NaNO₃ ($2.25 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$), H₃BO₃ ($1.92 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$), MnSO₄ + 7H₂O ($1.06 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$), ZnSO₄ + 7H₂O ($7 \times 10^{-10} \text{ mol l}^{-1}$), CuSO₄ ($3.2 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$), Na₂MoO₄ + 2H₂O ($1 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$), CoCl₂ + 6H₂O ($8.4 \times 10^{-11} \text{ mol l}^{-1}$) and C₁₄H₁₈FeN₃Na₂O₁₀ ($5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$). For each atmospheric CO₂ condition, half of the pots were inoculated with the bacterium *P. fluorescens* C7R12.

A glass pot attached to the cover allowed the plant development to occur in a sterile environment at the beginning of its growth. After 15 days of seedling growth, glass pots were removed and gas-proof silicone (RHODORSIL® RTV 3325 with 5 % of catalyst; GACHES CHIMIE Spécialités, Illzach, France) was disposed around the hypocotyl to maintain gnotobiotic conditions in the soil while allowing aerial parts of the plant to grow at atmospheric conditions chosen.

Plants were cultivated for 63 days in growth chamber with a 16/8 h light/dark photoperiod and 23/18 °C light/dark thermoperiod. The amount of photosynthetic active radiation at pots height was 500 $\mu\text{Einstein m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The growth chamber had a capacity of about 9 m³ and could be used or not as a gas-proof system to allow the enrichment of the total atmosphere of the growth chamber. Such only one gas-proof growth chamber was available, two successive experiments were undertaken for each experiment, 30 pots at ambient CO₂ concentration (measured at 365 ppm) in a no gas-proof version (15 inoculated and 15 not inoculated) following by 30 pots at 750 ppm in a gasproof version (15 inoculated and 15 not inoculated). To obtain a constant and uniformly enriched atmosphere, the CO₂ concentration was measured continuously during experiment using an infrared gas analyser (IRGA; PP system; Ciras, Montigny le Bretonneux, France) and maintained by automatic CO₂ injection as in Voisin *et al.* [36].

Preparation of *Pseudomonas fluorescens* strain C7R12 inoculums

Pseudomonas fluorescens C7R12 was grown on King B agar medium plates (KMB agar) [37] for 48 h at 25 °C and cells were harvested and washed once in sterile demineralized water. The cell density was determined spectrophotometrically at 600 nm and adjusted with sterile demineralized water to inoculate the substrate at 10⁶ CFU (Colony Forming Unit) g⁻¹ of dry substrate. The same volume of demineralized water was added to the uninoculated treatment to obtain the same substrate humidity.

Quantification of plant traits

The kinetics of plant development was followed by counting the number of leaves twice a week. Reproductive potential was estimated as the number of pods and seeds at the Fp and Pf stages.

At each growth stage, five plants per condition were analysed as follows. Shoots, roots, pods and seeds were separated and their biomass was determined after desiccation at 105 °C for 24 h. Dry shoots, roots, pods and seeds were ground in a grinding bowl with a steel ball in a

mixer-mill (vibro-broyeur Retsch MM 301). The carbon (C) and nitrogen (N) contents in the different plant compartments were quantified using Dumas procedure in an elemental analyser (ThermoElectron NC2500 elemental analyser).

Quantification of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 density and gnotobiotic conditions assessment

The density of *P. fluorescens* C7R12 in both the rhizosphere soil and the root was determined during the interaction with the plant by counting the number of CFU on KMB agar supplemented with rifampicin (100 mg l^{-1}). For each date of analysis, the initial suspension of soil adhering to the roots (rhizosphere soil) was sampled by vortexing the root in 100 ml of sterile demineralized water. Once cleared from their rhizosphere soil, roots were dried on sterile filter paper and 1.5 g taken randomly at different locations of the roots were ground in a sterile mortar. The ground roots obtained were recovered in 10 ml of sterile demineralized water to form initial root suspensions. Bacterial population of this root suspensions correspond to bacteria attached to the root surface (rhizoplane) and present in the roots (endophyte).

Potential bacteria and fungi contaminants were analysed. For bacteria, the medium TSA 1 / 10 (tryptic soy agar) was used. This medium was composed, for 1 l of demineralised water, of 15 g tryptone, 5 g soy peptone, 5 g sodium chloride and 15 g agar. The pH was adjusted to 7.3. The medium was sterilized at 110°C for 45 min and cycloheximide was added (100 mg l^{-1}). For fungi, the malt acid medium was used. It was constituted, for 1 l of demineralized water, of 10 g of malt and 15 g agar, then autoclaved for 20 min at 120°C . Before use, 250 mg l^{-1} of citric acid, streptomycin (100 mg l^{-1}) and chlortetracycline (50 mg l^{-1}) were added.

Statistical analysis

Normality and equal variances were tested respectively by Shapiro-Wilk and Bartlett tests. When necessary, data were log-transformed to achieve normality. Most plant data were analysed by linear models with condition of inoculation, CO_2 concentration and developmental stage as fixed factors and with their interactions, all being nested within the experiment replicate factor. Since parameters on seeds were only measured during the second experiment replicate, this replicate factor was not taken into account in the analysis. For the leaves number, an ANOVA for repeated measures was made because this trait was measured several times on the same plants. The densities of microorganisms were analysed with

ANOVA using as explanatory fixed factors the developmental stage and CO₂ concentration and their interactions, nested within the replicate experiment factor.

All values presented in the text are mean \pm s.e.m. The analyses were performed using the statistical software JMP 5.0.1. with an alpha level of 0.05.

Results

No bacterial or fungal contaminant was detected, at thresholds detections, respectively 23.35 and 233.53 CFU g⁻¹ of dry substrate, during the experiment. For most of the traits measured on the plant or bacteria, there was a variation between the two experimental replicates (Tables 1.1, 1.2, 1.3 and 1.4). This variation nevertheless never masked other sources of variation, notably interactions between factors, results being congruent between replicates. This source of variation will therefore not be discussed further.

CO₂ and *P. fluorescens* C7R12 effect on vegetative growth and development of *M. truncatula*

The number of leaves increased exponentially with time, reflecting plant development and growth. The leaves appeared more rapidly at elevated CO₂ concentration. This CO₂-induced acceleration of development was amplified when plants were inoculated with *P. fluorescens* C7R12. (Table 1.1, Figure 1.1).

Table 1.1 Results of the ANOVA with repeated measures explaining the number of leaves of *Medicago truncatula*, as a function of inoculation conditions (inoculated or not with *Pseudomonas fluorescens* C7R12), CO₂ concentration (ambient, 365 ppm or enriched, 750 ppm), the plant developmental stage (V and Fp, see text) and the experimental replicate.

Source of variation	dfNum	dfDenom	F	P
Between subjects				
Replicate	1	69	113.06	<0.0001
Inoculation	1	69	11.20	0.0013
CO ₂	1	69	38.62	<0.0001
Inoculation*replicate	1	69	0.72	0.40
CO ₂ *replicate	1	69	0.48	0.49
CO ₂ *inoculation	1	69	12.85	0.0006
CO ₂ *inoculation*replicate	1	69	0.02	0.90
Within subjects				
Time	6	64	3891.13	<0.0001
Time*Replicate	6	64	51.93	<0.0001
Time*Inoculation	6	64	3.59	0.0040
Time*CO ₂	6	64	25.70	<0.0001
Time*Inoculation*replicate	6	64	0.87	0.52
Time*CO ₂ *replicate	6	64	8.33	<0.0001
Time*CO ₂ *inoculation	6	64	2.65	0.0235
Time*CO ₂ *inoculation*replicate	6	64	1.56	0.17

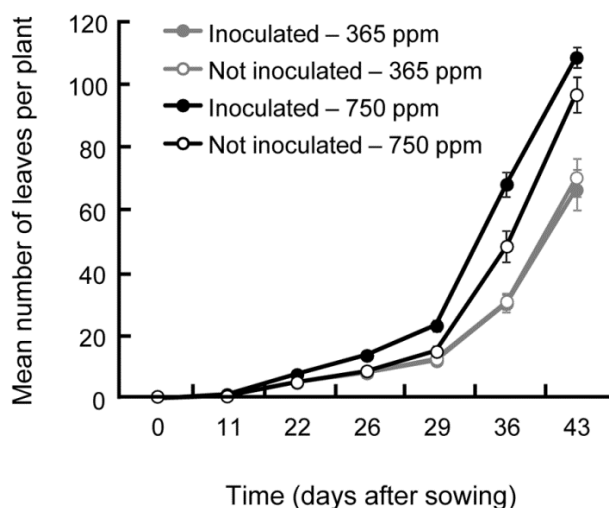


Figure 1.1 Average number of leaves of *Medicago truncatula* over its growth. The number of leaves depends on the CO₂ concentration and the inoculation with *Pseudomonas fluorescens* C7R12. An ANOVA for repeated measures was made because this trait was measured several times on the same plants. Standard errors are represented by vertical bars. V and Fp corresponds to the plant developmental stages analysed in the experiment.

The shoot and root biomass increased over time and were significantly higher when CO₂ concentration increased (76.52 % and 41.30 % respectively; Table 1.2A, B). A positive *P. fluorescens* C7R12 effect was found only at stage V for shoot (Table 1.2A) where biomass was twice higher with the bacteria. In the root compartment, this positive effect of *P. fluorescens* C7R12 inoculation was found regardless the other parameters (Table 1.2B). For these vegetative plant traits, the effect of *P. fluorescens* C7R12 and CO₂ never interact (Table 1.2A, B).

Table 1.2 Linear models explaining the vegetative traits of *Medicago truncatula* as a function of inoculation conditions (inoculated or not with *Pseudomonas fluorescens* C7R12), CO₂ concentration (ambient, 365 ppm or enriched, 750 ppm), the plant developmental stage (V, Fp and Pf, see text) and the experimental replicate (nested factor), excepting for the C/N ratios (C,D) which were measured in the second experiment only for the Fp and Pf stages.

Source of variation	df	Sum of Squares	F Ratio	P
(A) Shoot dry biomass				
Replicate	1	0.44	7.91	0.0061
Inoculation [replicate]	2	0.33	2.94	0.06
CO₂ [replicate]	2	3.96	35.25	<0.0001
Developmental stage [replicate]	4	49.54	220.69	<0.0001
Inoculation*CO ₂ [replicate]	2	0.12	1.05	0.35
Inoculation*Developmental stage [replicate]	4	0.78	3.47	0.0111
CO ₂ *Developmental stage [replicate]	4	0.26	1.14	0.34
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage [replicate]	4	0.11	0.48	0.75
Error	88	4.94		
(B) Root dry biomass				
Replicate	1	0.00	0.05	0.83
Inoculation [replicate]	2	0.61	5.48	0.0057
CO₂ [replicate]	2	0.90	8.07	0.0006
Developmental stage [replicate]	4	23.21	104.40	<0.0001
Inoculation*CO ₂ [replicate]	2	0.04	0.35	0.71
Inoculation*Developmental stage [replicate]	4	0.28	1.27	0.29
CO ₂ *Developmental stage [replicate]	4	0.34	1.52	0.20
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage [replicate]	4	0.17	0.75	0.56
Error	88	4.89		
(C) C/N of shoot				
Inoculation	1	0.01	3.81	0.06
CO₂	1	0.49	204.12	<0.0001
Developmental stage	1	0.67	279.58	<0.0001
Inoculation*CO ₂	1	0.01	2.97	0.09
Inoculation*Developmental stage	1	0.09	35.54	<0.0001
CO ₂ *Developmental stage	1	0.00	1.47	0.23
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage	1	0.00	0.72	0.40
Error	75	1.35		
(D) C/N of root				
Inoculation	1	0.00	3.95	0.05
CO₂	1	0.01	12.04	0.0009
Developmental stage	1	0.06	125.76	<0.0001
Inoculation*CO₂	1	0.01	22.84	<0.0001
Inoculation*Developmental stage	1	0.01	13.01	0.0006
CO₂*Developmental stage	1	0.00	4.24	0.0433
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage	1	0.00	0.01	0.92
Error	75	0.13		

In a qualitative viewpoint, the shoot and root C/N ratio raised over time. Shoot C/N ratio was more important under increased CO₂ concentration, regardless the date of analysis (Table 1.2C, D). For root, the C/N ratio was higher at stage Fp for 750 ppm (Table 1.2D) but CO₂ concentration played no role at stage Pf. The condition of inoculation played a role in interaction with the developmental stage for the two compartments. The C/N ratio increased with the developmental stage but was lower at stage Pf when the bacteria interact with the plant (Figure 1.2A, B). These effects at Pf stage on the C/N ratio may be linked to the N content in those compartments at this stage (Figure 1.3A, B).

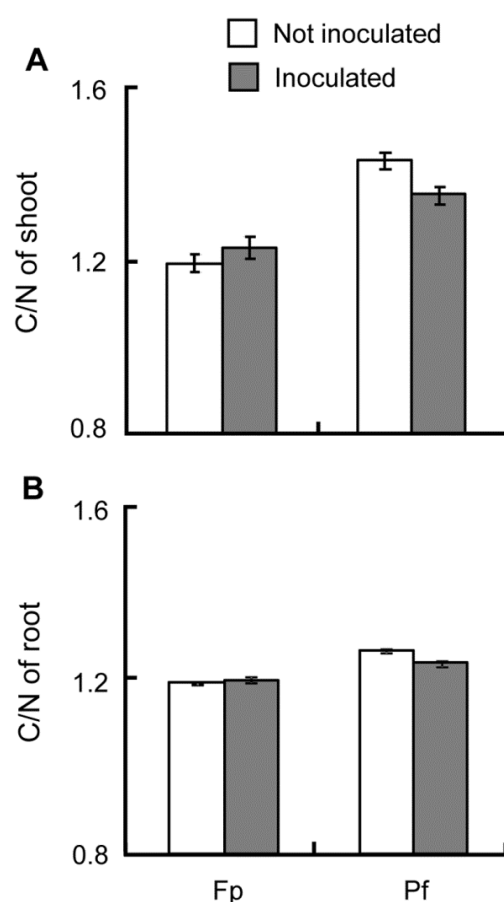


Figure 1.2 Average C/N ratio for shoot and root of *Medicago truncatula*. Average C/N ratio for the shoot (A) and the root (B) depends on the developmental stage (Fp, Pf, see text) and the condition of inoculation (Inoculated or not with *Pseudomonas fluorescens* C7R12). Data were log-transformed to achieve normality and equal variances respectively tested by Shapiro-Wilk and Bartlett tests. Carbon-Nitrogen ratio, measured during the second experiment replicate only, was analysed by linear model with condition of inoculation, CO₂ concentration and developmental stage as fixed factors and with their interactions. Standard errors are represented by vertical bars.

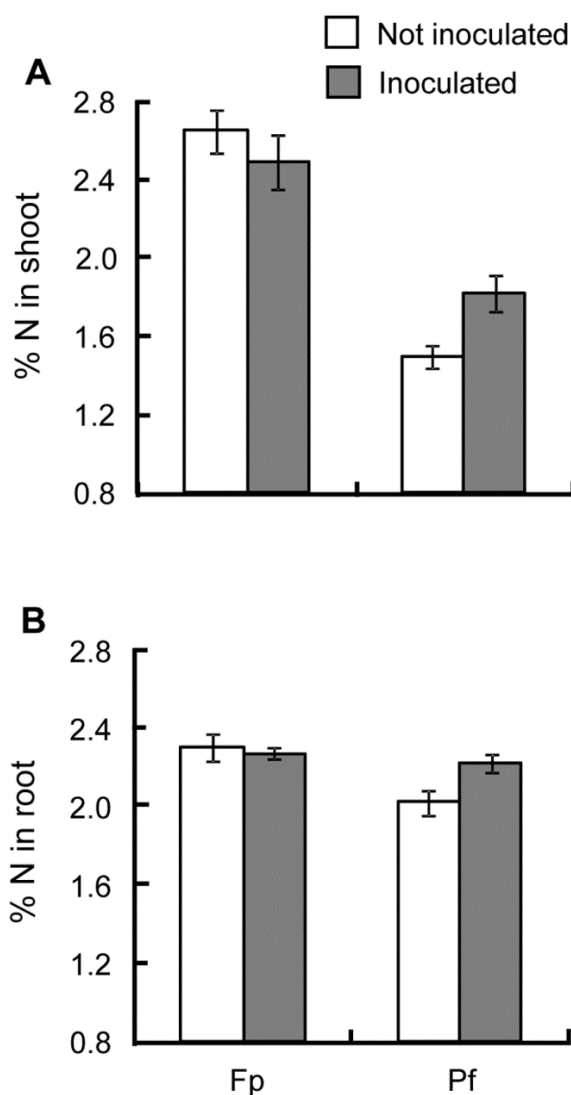


Figure 1.3 Average percentage of Nitrogen in *Medicago truncatula* shoot and root. Average percentage of Nitrogen in the shoot (A) and the root (B) depends on the developmental stage (Fp, Pf, see text) and the condition of inoculation (Inoculated or not with *Pseudomonas fluorescens* C7R12). The percentage of N, measured during the second experiment replicate only, was analysed by linear model with condition of inoculation, CO₂ concentration and developmental stage as fixed factors and with their interactions. Standard errors are represented by vertical bars.

CO₂ and *P. fluorescens* C7R12 effect on reproductive traits of *M. truncatula*

For the first experimental replicate, the flowers appeared after 34 days and the pods after 35 days, in the ambient CO₂ concentration. In contrast, when plants were subjected to an enrichment of the CO₂ concentration, flowering began at 28 days and the pod apparition at 32 days.

The number of flowers and pods were both significantly influenced by CO₂ concentration in interaction with the developmental stage (Table 1.3A, B). Plants growing at high CO₂ concentration had more flowers at stage Pf (ambient: 12.15 ± 2.72 versus elevated: 16.47 ± 2.09) and 3.5 times more pods at this stage. The presence of *P. fluorescens* C7R12 never influenced these two traits significantly, either alone or in interaction with another factor (Table 1.3A, B).

Table 1.3 Linear models explaining the reproductive traits of *Medicago truncatula* as a function of inoculation conditions (inoculated or not with *Pseudomonas fluorescens* C7R12), CO₂ concentration (ambient, 365 ppm or enriched, 750 ppm) and the plant developmental stage (Fp and Pf, see text), excepting for the pod mass (C) which was measured in the second experimental replicate only.

Source of variation	df	Sum of Squares	F Ratio	P
(A) Number of flowers				
Replicate	1	6.83	202.81	<0.0001
Inoculation [replicate]	2	0.17	2.55	0.09
CO ₂ [replicate]	2	2.72	40.43	<0.0001
Developmental stage [replicate]	2	2.14	31.73	<0.0001
Inoculation*CO ₂ [replicate]	2	0.06	0.82	0.45
Inoculation*Developmental stage [replicate]	2	0.21	3.07	0.05
CO ₂ *Developmental stage [replicate]	2	0.63	9.36	0.0003
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage [replicate]	2	0.14	2.04	0.14
Error	60	2.02		
(B) Number of pods				
Replicate	1	0.53	8.09	0.0061
Inoculation [replicate]	2	0.09	0.67	0.52
CO ₂ [replicate]	2	2.49	19.03	<0.0001
Developmental stage [replicate]	2	0.97	7.39	0.0014
Inoculation*CO ₂ [replicate]	2	0.26	2.02	0.14
Inoculation*Developmental stage [replicate]	2	0.14	1.05	0.36
CO ₂ *Developmental stage [replicate]	2	4.72	36.05	<0.0001
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage [replicate]	2	0.17	1.29	0.28
Error	60	3.93		
(C) Mass of one pod				
Inoculation	1	0.03	1.33	0.26
CO ₂	1	0.49	26.05	<0.0001
Developmental stage	1	5.81	306.18	<0.0001
Inoculation*CO ₂	1	0.06	2.96	0.10
Inoculation*Developmental stage	1	0.07	3.80	0.06
CO ₂ *Developmental stage	1	0.00	0.25	0.62
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage	1	0.01	0.69	0.41
Error	37	6.92		

Total number of seeds per plant rose over time (Table 1.4A, Figure 1.4), and the condition of inoculation influenced this dynamics in interaction with CO₂ concentration. At stage Fp, the plants interacting with bacteria produced 7.45 times more seeds at high CO₂ concentration, while plants without bacteria produced the same number of seeds whatever the CO₂ concentration. At stage Pf, this CO₂-induced increase in the number of seeds was still observable. However, at this stage, the number of seeds was not significantly influenced by the inoculation (Figure 1.4).

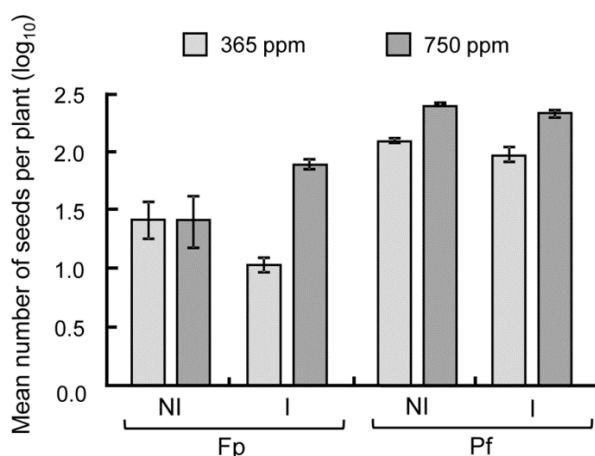


Figure 1.4 Average number of seeds per plant. Average number of seeds per plant depends on the CO₂ concentration (ambient, 365 ppm or enriched, 750 ppm), the condition of inoculation (I: inoculated or NI: not with *Pseudomonas fluorescens* C7R12) and the developmental stage of *Medicago truncatula* (Fp, Pf, see text). Data were log-transformed to achieve normality and equal variances respectively tested by Shapiro-Wilk and Bartlett tests. Number of seeds, measured during the second experiment replicate only, was analysed by linear model with condition of inoculation, CO₂ concentration and developmental stage as fixed factors and with their interactions. Standard errors are represented by vertical bars.

Table 1.4 Linear models explaining the quantitative (A) and qualitative (B,C,D) aspects of seeds of *Medicago truncatula* as a function of inoculation conditions (inoculated or not with *Pseudomonas fluorescens* C7R12), CO₂ concentration (ambient, 365 ppm or enriched, 750 ppm) and the plant developmental stage (Fp and Pf, see text).

Source of variation	df	Sum of Squares	F Ratio	P
(A) Number of seeds per plant				
Inoculation	1	0.01	0.42	0.52
CO ₂	1	0.56	25.82	<0.0001
Developmental stage	1	4.42	202.25	<0.0001
Inoculation*CO ₂	1	0.63	28.81	<0.0001
Inoculation*Developmental stage	1	0.05	2.18	0.15
CO ₂ *Developmental stage	1	0.02	0.93	0.34
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage	1	0.34	15.53	0.0006
Error	25	0.55		
(B) Mass of one seed				
Inoculation	1	0.11	1.46	0.24
CO ₂	1	0.05	0.72	0.40
Developmental stage	1	5.28	72.20	<0.0001
Inoculation*CO ₂	1	0.02	0.33	0.57
Inoculation*Developmental stage	1	0.06	0.89	0.36
CO ₂ *Developmental stage	1	0.02	0.22	0.64
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage	1	0.01	0.12	0.73
Error	32	7.26		
(C) C/N Ratio in seeds				
Inoculation	1	0.27	6.17	0.0162
CO ₂	1	0.19	4.33	0.0423
Developmental stage	1	0.62	14.38	0.0004
Inoculation*CO ₂	1	0.00	0.00	0.99
Inoculation*Developmental stage	1	0.00	0.01	0.93
CO ₂ *Developmental stage	1	0.00	0.02	0.88
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage	1	0.09	2.07	0.16
Error	52	2.25		
(D) %N in seeds				
Inoculation	1	0.37	5.91	0.0186
CO ₂	1	0.29	4.67	0.0353
Developmental stage	1	5.41	87.30	<0.0001
Inoculation*CO ₂	1	0.04	0.67	0.42
Inoculation*Developmental stage	1	0.05	0.75	0.39
CO ₂ *Developmental stage	1	0.06	1.00	0.32
Inoculation*CO ₂ *Developmental stage	1	0.06	1.04	0.31
Error	59	11.01		

The pod and seed masses showed a rise through developmental stages (Tables 1.3C and 1.4B) and the pod mass was higher under elevated CO₂ (Table 1.3C).

Finally, the C/N ratio of seeds (Table 1.4C) was higher when the plant received elevated CO₂ concentration (Figure 1.5A). This ratio was lower in the presence of the bacterial strain (Figure 1.5B) and over developmental stages (Table 1.4C, data not shown) but no interaction between these factors was significant (Table 1.4C). This was due to a higher N content in seeds with the bacterial strain (Table 1.4D).

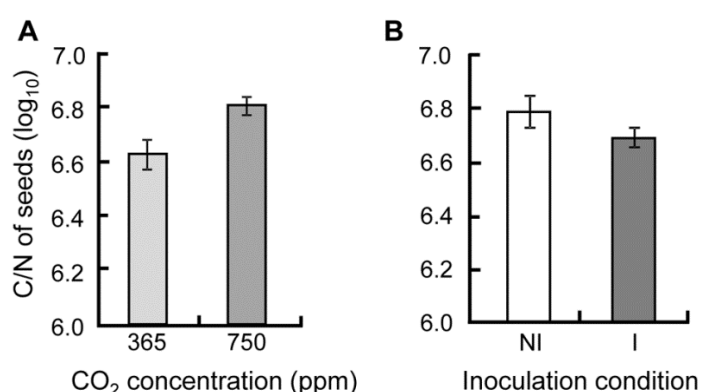


Figure 1.5 Carbon-Nitrogen ratio of *Medicago truncatula* seeds. Carbon-Nitrogen ratio of seeds depends on (A) the CO₂ concentration (ambient, 365 ppm or enriched, 750 ppm) and (B) the condition of inoculation (I: inoculated or NI: not with *Pseudomonas fluorescens* C7R12). Data were log-transformed to achieve normality and equal variances respectively tested by Shapiro-Wilk and Bartlett tests. Carbon-Nitrogen ratio, measured during the second experiment replicate only, was analysed by linear model with condition of inoculation, CO₂ concentration and developmental stage as fixed factors and with their interactions. Standard errors are represented by vertical bars.

CO₂ effect on *P. fluorescens* C7R12 fitness

Preliminary tests confirmed the absence of difference in *P. fluorescens* C7R12 densities between the two CO₂ treatments after 15 days of growth ($F_{1,19}=0.21$, $P=0.65$) and thus validate the initial conditions of our experiment.

The bacterial density in the rhizosphere soil compartment was influenced by CO₂ concentration in interaction with the plant developmental stage (Table 1.5A). At ambient CO₂ concentration, the bacterial density was more or less constant whereas at enriched CO₂ there was a drop in bacterial density during the stage Fp (Figure 1.6A). There was a general decrease in concentration of bacteria associated intimately with root (including bacteria attached to the root surface (rhizoplane) and present in the roots (endophyte)) over developmental stages (Table 1.5B), and, again, the effect of CO₂ concentration led to a bacterial density slightly lower under high CO₂ concentration (Figure 1.6B).

Table 1.5 ANOVA explaining the density of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 in the rhizosphere soil (A) and the plant roots (B), as a function of CO₂ concentration (ambient, 365 ppm or enriched, 750 ppm), the plant developmental stage (V, Fp and Pf, see text) and the experimental replicate (nested factor).

Source of variation	df	Sum of Squares	F Ratio	P
(A) Bacterial density in Rhizosphere soil				
Replicate	1	0.93	11.06	0.0017
CO ₂ [replicate]	2	0.62	3.66	0.0334
Developmental stage [replicate]	4	3.74	11.12	<0.0001
CO ₂ *Developmental stage [replicate]	4	2.11	6.28	0.0004
Error	46	3.87		
(B) Bacterial density in Root				
Replicate	1	5.23	30.95	<0.0001
CO ₂ [replicate]	2	2.04	6.04	0.0047
Developmental stage [replicate]	4	14.89	22.01	<0.0001
CO ₂ *Developmental stage [replicate]	4	2.37	3.50	0.0141
Error	46	7.78		

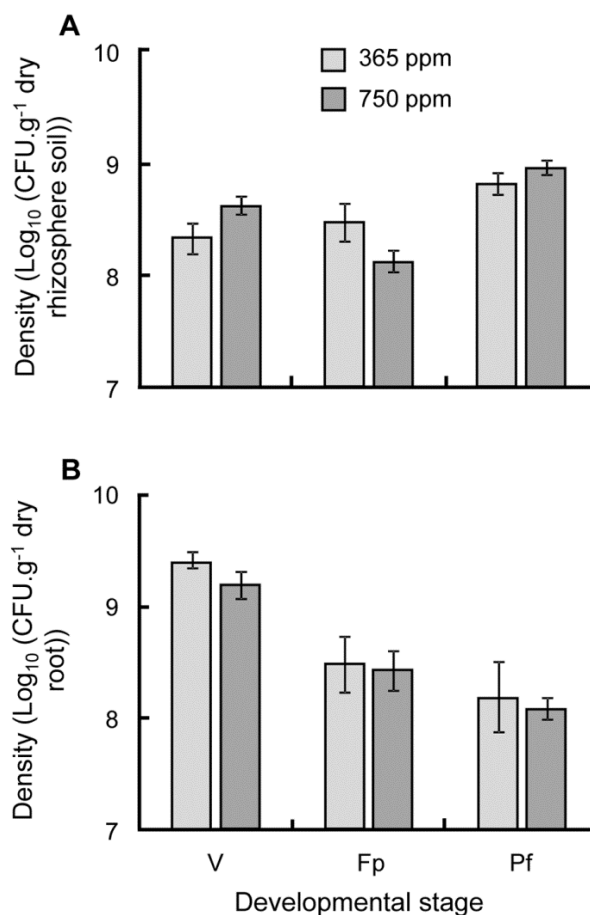


Figure 1.6 Average density of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 over time. The density of the bacterial strain was measured for the developmental stages chosen (V: vegetative; Fp: Flowers, some pods; Pf: Pods, some flowers) in compartments (A) rhizosphere soil and (B) root. Data were log-transformed to achieve normality and equal variances respectively tested by Shapiro-Wilk and Bartlett tests. The densities of microorganisms were analysed with ANOVA using as explanatory fixed factors the developmental stage and CO₂ concentration and their interactions, nested within the replicate experiment factor. Standard errors are represented by vertical bars.

Discussion

CO₂ enrichment and *P. fluorescens* C7R12 interact positively on *M. truncatula* development and growth

Carbon dioxide enrichment in the atmosphere usually leads to a faster shoot development and positive effects on both shoot and root growth. These effects have been often demonstrated in the literature [38,39]. They presumably result from an increase in the plant photosynthetic rate due to the higher CO₂ enrichment, the enhanced photosynthates production being invested in plant biomass [16,18].

During the early periods of the growth cycle, the presence of the bacterium improved shoot growth. During this vegetative stage, plants release numerous carbon compounds [34], made available for bacteria, which promotes in turn root and shoot growth. As observed for shoot biomass at vegetative stage, that of roots was also increased when the *P. fluorescens* and *M. truncatula* interacted regardless to the developmental stage or the CO₂ concentration. This result confirms the effect of *P. fluorescens* C7R12 on root growth and architecture on *M. truncatula* [31, 33]. Moreover, when the plant interacts with the bacteria, its N content in shoot and root parts was higher regardless the CO₂ concentration revealing a positive effect of *P. fluorescens* C7R12 on nitrogen nutrition of *M. truncatula*. If some N₂-fixing *P. fluorescens* strains have been identified [40], there is no evidence that *P. fluorescens* C7R12 has this capacity. Another hypothesis is linked to the ability of *P. fluorescens* C7R12 to increase plant iron nutrition [41] which allows better photosynthetic functioning [42] and so an efficient intake of CO₂ and probably of nutrients necessary for this process.

Interaction between CO₂ and *P. fluorescens* C7R12 on reproductive traits of *M. truncatula*

The increase in both plant biomass and the number of reproductive structures observed in our study throughout the growth cycle demonstrates that our specifically developed gnotobiotic system did not perturb plant development and growth.

Under elevated CO₂, the higher biomass production impacted positively on the number of reproductive organs, flowers and pods. These observations are consistent with other studies [43,44] and can be explained by physiological changes when the plant receives a larger amount of carbon.

The dynamics in seeds production differed according to CO₂ conditions and the plant developmental stages during the interaction between the plant and the bacteria. In presence of *P. fluorescens* C7R12, the plant produced a high number of seeds at the early reproductive

stage under high CO₂. Later in the development, the amount of seeds produced was similar with and without the bacteria under elevated CO₂. Reaching faster (beginning of flowering appeared 6 days before) a high reproductive capacity is likely to give a selective advantage to the plant in natural environments. Early production of numerous offspring could provide a competitive advantage for future germination, and/or compensate early plant mortality in an unpredictable environment [45]. This phenomenon could also be interpreted in another way. It is well known that living organisms can plastically invest in early reproduction when they experience a stress such as parasitic pressure (e.g. [46,47]). Here, such a phenomenon could appear paradoxical because it is observed in conditions *a priori* favourable for the plant, i.e. under high CO₂ concentration and in presence of a mutualistic partner. However, the transient decrease in bacterial density in the soil at this stage of plant development (see discussion below) could induce a transient stress for the plant, which could plastically adjust its reproductive effort at that stage. In addition to this increased early reproductive effort, seeds contained more nitrogen when the plant interacted with *P. fluorescens* C7R12, an additional advantage because nitrogen is fundamental in seeds development and in its quality [48]. This fits the prediction that the inoculation with *P. fluorescens* C7R12 provides an advantage in terms of plant reproduction under elevated CO₂ concentration.

CO₂ and *M. truncatula* effect on *P. fluorescens* C7R12

The hypothesis was that plants subjected to a high CO₂ concentration, release more carbon compounds, would support a higher bacterial density in the rhizosphere corresponding to an increase in its carrying capacity [13]. However, our experimental results did not support this hypothesis. Globally, bacteria did not increase in density and even had transiently a lower fitness during the plant development. At Fp stage, there was a decrease in bacterial density in the rhizosphere soil under higher CO₂ condition. This transient drop in bacterial density may be due to a tradeoff between fueling soil micro-organisms and ensuring the reproductive potential. As such, the decrease in density at Fp stage could therefore coincide with both quantitative and qualitative changes [34] of carbon compounds released by plants in the rhizosphere [49]. Another explanation would be that competition occurred between the two partners: the seed C/N ratio was lower in the presence of bacteria which may result from a lower N allocation to the bacterium [16]. Therefore, interpreting the impact of an increased quantity of carbon made available for *P. fluorescens* C7R12 fitness is not straightforward.

Changes in the cost/benefit balance due to increase in atmospheric CO₂

Pseudomonas fluorescens C7R12 often provides an advantage in plant growth, during the vegetative stages, independent of CO₂ conditions [50]. Although this growth advantage is interesting in an agricultural context for yield enhancement, it is however more questionable for the plant from an evolutionary point of view if it is not translated in an advantage in producing more viable offspring. Bacteria provided a qualitative advantage to the plant fitness, seeds containing more nitrogen. This advantage was associated with the presence of the bacteria, whatever the CO₂ conditions, which only marginally influenced the bacterial density in the final stage of our study. The above advantage is therefore not linked to bacterial quantities.

In contrast with this qualitative advantage provided by the bacteria, one quantitative advantage was CO₂ condition dependent. Inoculated plants produced more seeds than uninoculated ones at an early stage of reproduction, and under high concentration of CO₂ only. In this later case, however, it is worth noting that this transient increase in plant reproductive capacity corresponded with the transient drop in bacterial density under high CO₂ condition. Paradoxically, the benefit for *M. truncatula* to interact with *P. fluorescens* C7R12 was linked with a decrease in bacterial density. This could be due to an amplification or modification of bacterial metabolic activity [13,51], and the benefit for the plant could result from a quantitative and/or qualitative change of the plant metabolites supplied by the bacterium [13,52,53]. However, it could also mean that the plant could transiently benefit from the decrease in bacterial density. Under such a hypothesis, interacting with too many bacteria at the stage where reproduction begins would be more detrimental than beneficial for the plant fitness. This would mean that the nature of the interaction changed with the CO₂ increase. In that case, the plants would be the driver of changes in quantity and/or quality of their metabolites leading to decreased bacterial density. Finzi *et al.* [52] have shown that under elevated atmospheric CO₂ condition, rhizodeposits are enriched in carbon while depleted in nitrogen. Consequently these rhizodeposits could be more difficult to metabolize for microorganisms lacking nitrogen [19]. Even if such a hypothesis remains to be tested, the mutualistic relationship between *M. truncatula* and *P. fluorescens* C7R12 therefore seems to be transiently destabilized under elevated CO₂, revealing that under nearly unlimited carbon, supplying the mutualistic bacteria could be more costly than beneficial for the plant.

Acknowledgements

The authors are grateful to G. Duc (URLEG-INRA, Dijon, France) for seeds of *M. truncatula* and C. Jeudy for the regulation of CO₂ concentration in the growth chamber. The authors thank the two anonymous reviewers for their valuable comments.

References

1. van der Heijden MGA, Bardgett RD, van Straalen NM (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett* 11: 296-310.
2. Vance CP, Heichel GH (1991) Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annu Rev Plant Phys* 42: 373-392.
3. Bago B, Pfeiffer PE, Shachar-Hill Y (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiol* 124: 949-957.
4. Young ND, Mudge JE, Ellis THN (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Curr Opin Plant Biol* 6: 199-204.
5. Douglas AE (2008) Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytol* 177: 849-858.
6. Johnstone RA, Bshary R (2008) Mutualism, market effects and partner control. *J Evolution Biol* 21: 879-888.
7. Bever JD, Richardson SC, Lawrence BM, Holmes J, Watson M (2009) Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecol Lett* 12: 13-21.
8. Lambers H, Mougél C, Jaillard B, Hinsinger P (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant Soil* 321: 83-115.
9. Thompson JN, Cunningham BM (2002) Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature* 417: 735-738.
10. Phillips RL, Zak DR, Holmes WE, White DC (2002) Microbial community composition and function beneath temperate trees exposed to elevated atmospheric carbon dioxide and ozone. *Oecologia* 131: 236-244.
11. Wardle DA, Bardgett RD, Klironomos JN, Setälä H, van der Putten WH, et al. (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science* 304.
12. Carney KM, Hungate BA, Drake BG, Megonigal JP (2007) Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *P Natl Acad Sci USA* 104: 4990–4995.
13. Drigo B, Kowalchuk GA, van Veen JA (2008) Climate change goes underground: effects of elevated atmospheric CO₂ on microbial community structure and activities in the rhizosphere. *Biol Fert Soils* 44: 667-679.

14. Nguyen C (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* 23: 375-396.
15. Ziska LH, Bunce JA (2006) Plant responses to rising atmospheric carbon dioxide. In: Morison JIL, Morecroft MD, editors. *Plant growth and climate change*. Oxford: Blackwell Publishing. pp. 17-47.
16. Reich PB, Hungate BA, Luo Y (2006) Carbon-nitrogen interactions in terrestrial ecosystems in response to rising atmospheric carbon dioxide. *Annu Rev Ecol Syst* 37: 611-636.
17. Luo Y, Sims DA, Griffin KL (1998) Nonlinearity of photosynthetic responses to growth in rising atmospheric CO₂: an experimental and modelling study. *Glob Change Biol* 4: 173-183.
18. Luo Y, Hui D, Zhang D (2006) Elevated CO₂ stimulates net accumulations of carbon and nitrogen in land ecosystems: a meta-analysis. *Ecology* 87: 53-63.
19. Deneff K, Bubenheim H, Lenhart K, Vermeulen J, van Cleemput O, et al. (2007) Community shifts and carbon translocation within metabolically-active rhizosphere microorganisms in grasslands under elevated CO₂. *Biogeosciences* 4: 769-779.
20. Woodward FI (2002) Potential impacts of global elevated CO₂ concentrations on plants. *Curr Opin Plant Biol* 5: 207-211.
21. Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattee Y, Duc G, et al. (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol Biol Rep* 8: 40-49.
22. Cook DR (1999) *Medicago truncatula* – a model in the making! *Curr Opin Plant Biol* 2: 301-304.
23. Colebatch G, Trevaskis B, Udvardi M (2002) Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics area. *New Phytol* 153: 37-42.
24. Stacey G, Libault M, Brechenmacher L, Wan J, May GD (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr Opin Plant Biol* 9: 110-121.
25. Thoquet P, Ghérardi M, Journet EP, Kereszt A, Ané JM, et al. (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC Plant Biol* 2: 1.
26. Zhu H, Choi HK, Cook DR, Shoemaker RC (2005) Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiol* 137: 1189-1196.

27. Blondon F, Marie D, Brown D, Kondorosi A (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome* 37: 264-270.
28. Lemanceau P (1992) Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie* 12: 413-437.
29. Eparvier A, Lemanceau P, Alabouvette C (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiol Ecol* 86: 177-184.
30. Lemanceau P, Samson R, Alabouvette C (1988). Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XV. Comparaison des populations de *Pseudomonas* fluorescents dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie* 8: 243-249.
31. Pivato B, Gamalero E, Lemanceau P, Berta G (2008) Colonization of adventitious roots of *Medicago truncatula* by *Pseudomonas fluorescens* C7R12 as affected by arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiol Lett* 289: 173-180.
32. Sanchez L, Weidmann S, Brechenmacher L, Batoux M, van Tuinen D, et al. (2004) Common gene expression in *Medicago truncatula* roots in response to *Pseudomonas fluorescens* colonization, mycorrhiza development and nodulation. *New Phytol* 161: 855-863.
33. Pivato B, Offre P, Marchelli S, Barbonaglia B, Mougel C, et al. (2009) Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza* 19: 81-90.
34. Mougel C, Offre P, Ranjard L, Corberand T, Gamalero E, et al. (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different development stages of *Medicago truncatula* Jemalong J5. *New Phytol* 170: 165-175.
35. Moreau D, Salon C, Munier-Jolain N (2007) A model-based framework for the phenotypic characterization of the flowering of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Environ* 30: 213-224.
36. Voisin AS, Salon C, Jeudy C, Warembourg FR (2003) Seasonal patterns of ¹³C partitionning between shoots and nodulated roots of N₂- or nitrate-fed *Pisum sativum* L. *Ann Bot-London* 91: 539-546.
37. King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocanin and fluorescin. *J Lab Clin Med* 44: 301-307.
38. Pritchard S, Rogers H, Prior S, Peterson C (1999) Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Glob Change Biol* 5: 807-837.
39. Arnone JA, Zaller JG, Spehn EM, Niklaus PA, Wells CE, et al. (2000) Dynamics of root systems in native grasslands: effects of elevated atmospheric CO₂. *New Phytol* 147: 73-85.

40. Barraquio WL, Ladha JK, Watanabe I (1983) Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Can J Microbiol* 29: 867-873.
41. Vansuyt G, Robin A, Briat JF, Curie C, Lemanceau P (2007) Iron acquisition from Fe-Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe In* 20: 441-447.
42. Briat JF (2007) Iron Dynamics in Plants. *Adv Bot Res* 46: 137-180.
43. Sanhewe AJ, Ellis RH, Hong TD, Wheeler TR, Batts GR, et al. (1996) The effect of temperature and CO₂ on seed quality development in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Exp Bot* 298: 631-637.
44. Huxman TE, Hamerlynck EP, Smith SD (1999) Reproductive allocation and seed production in *Bromus madritensis* ssp. *rubens* at elevated atmospheric CO₂. *Funct Ecol* 13: 769-777.
45. Stowe KA, Marquis RJ, Hochwender CG, Simms EL (2000) The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. *Annu Rev Ecol Syst* 31: 565-595.
46. Agnew P, Koella JC, Michalakakis Y (2000) Host life history responses to parasitism. *Microbes Infect* 2: 891-896.
47. Pagan I, Alonso-Blanco C, Garcia-Arenal F (2008) Host responses in life-history traits and tolerance to virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Pathogens* 4, e1000124.
48. Salon C, Munier-Jolain NG, Duc G, Voisin AS, Grandgirard D, et al. (2001) Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: A review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie* 21: 539-552.
49. Kuzyakov Y, Domanski G (2000) Carbon input by plants into the soil. *J Plant Nutr Soil Sc* 163: 421-431.
50. Bakker PAHM, Raaijmakers JM, Bloemberg GV, Höfte M, Lemanceau P, et al. (2007) New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. *Eur J Plant Pathol* 119: 241-242.
51. Williams MA, Rice CW, Owensby CE (2000) Carbon dynamics and microbial activity in tallgrass prairie exposed to elevated CO₂ for 8 years. *Plant Soil* 227: 127-137.
52. Finzi AC, Sinsabaugh RL, Long TM, Osgood MP (2006) Microbial community responses to atmospheric carbon dioxide enrichment in a warm-temperate forest. *Ecosystems* 9: 215-226.
53. Kuzyakov Y, Hill PW, Jones DL (2007) Root exudate components change litter decomposition in a simulated rhizosphere depending on temperature. *Plant Soil* 290: 293-305.

Supporting Information



Figure 1.S1 Description and illustration of a gnotobiotic pot. Gnotobiotic pot (A) made for the experiment allowing the growth of *Medicago truncatula* in microbiologically controlled conditions because of a glass pot (1) fixed to the cover with a plate (2) during 15 days at the beginning of growth. After this date, glass pot was removed and silicone was disposed around the hypocotyl (B). The plant was watered through a 0.2 μm filter (3). Air circulation is done through two air filters (4,5). The water outlet was controlled manually with a clamp (6). Figures (C) and (D) show more advanced developmental stage, corresponding to 35 days without and with the strain respectively, in CO_2 ambient conditions.

Conclusion du Chapitre I

Ce premier chapitre met en évidence l'existence du lien trophique qui relie les plantes et les microorganismes rhizosphériques. De plus, cette expérimentation nous permet d'observer les conséquences d'une hausse du CO₂ atmosphérique fourni à la plante sur la bactérie avec laquelle elle interagit et, en retour, l'effet dans de telles conditions, de la bactérie sur la croissance, le développement et la reproduction de cette plante. Globalement, cette augmentation du CO₂ a pour conséquence une déstabilisation temporaire de l'interaction entre *M. truncatula* et *P. fluorescens* en défaveur de la bactérie, cependant cette interaction semble rester positive pour la plante (Figure 1.7).

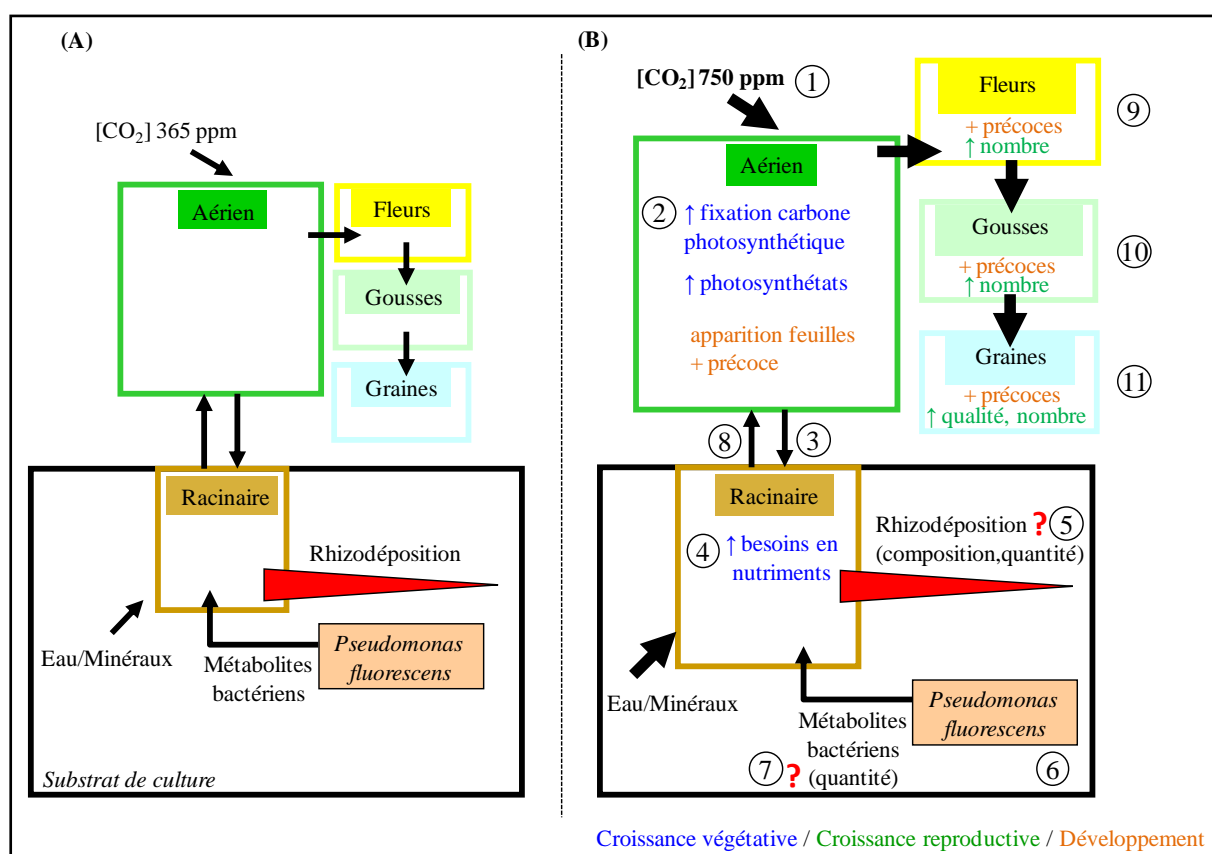


Figure 1.7 Bilan des (B) conséquences d'une hausse de la concentration en CO₂ atmosphérique à 750 ppm sur (A) l'interaction *Medicago truncatula*-*Pseudomonas fluorescens* soumise à une concentration ambiante en CO₂ à 365 ppm. (1) Quand le CO₂ atmosphérique apporté à la plante est augmenté, (2) la croissance (fixation photosynthétique du carbone et production de photosynthétats) et le développement de la plante sont stimulés ; (3) il y aura donc un investissement dans la biomasse racinaire et la croissance de ce

compartiment ; (4) afin de permettre à la plante d'augmenter sa biomasse racinaire puis aérienne, le besoin en nutriments va s'accroître ; (5) cette stimulation du métabolisme végétal peut laisser penser que la plante va libérer davantage de composés carbonés dans le sol dont la quantité et la composition pourront être altérées. (6) Cependant, la densité bactérienne ne change pas en fin d'expérience et subit même une diminution au cours du temps. (7) L'effet positif de la bactérie sur la plante ne résulte donc pas d'une modification en termes de densité bactérienne mais probablement d'un changement de fonctionnalité des communautés microbiennes. (8) Etant donné que l'eau et les éléments minéraux fournis à la plante ne sont pas des éléments limitants, alors la croissance racinaire puis aérienne de la plante est possible de même que l'investissement dans les stades reproducteurs. (9) La plante va donc produire plus précocement des fleurs dont le nombre final sera plus important ; (10) il y aura par conséquent davantage de gousses et (11) davantage de graines dont la qualité nutritionnelle (teneur en azote) sera améliorée.

Ces effets à court terme engendrent diverses questions quant aux mécanismes impliqués. Il serait intéressant de quantifier les exsudats racinaires libérés par la plante dans les deux conditions de CO₂ (ambiante et enrichie) et d'analyser leur composition afin de voir si l'effet négatif sur la densité bactérienne est du à une modification de la quantité et/ou qualité des exsudats racinaires. Il aurait également été intéressant de tester la capacité de germination des graines obtenues en condition de CO₂ enrichi. Cela aurait permis de confirmer, ou non, si la quantité plus importante de graines et leur meilleure qualité, en terme de teneur en azote, sont liées à un meilleur taux de germination et confère donc un réel avantage à la plante. De plus, afin de comprendre l'implication de la bactérie dans les bénéfices fournis à la plante, il serait intéressant de quantifier et analyser les métabolites bactériens fournis à la plante afin de mettre en évidence une éventuelle augmentation de leur quantité et/ou une meilleure qualité de ces métabolites.

CHAPITRE II

**Réduction de diversité de la communauté microbienne rhizosphérique:
croissance et succès reproducteur de trois espèces végétales et de leurs
symbiotes**

CHAPITRE II

Reduction de diversité de la communauté microbienne rhizosphérique: croissance et succès reproducteur de trois espèces végétales et de leurs symbiotes

Préambule

Le premier chapitre a présenté les interactions plantes-microorganismes dans un cadre simplifié et en intervenant sur l'interaction par l'intermédiaire de la plante. Ce second chapitre permet de complexifier les interactions plantes-microbes en se rapprochant de conditions de champ c'est-à-dire en utilisant une communauté microbienne dans son ensemble. De plus, la déstabilisation de l'interaction intervient cette fois au niveau du partenaire microbien par une dilution de la diversité de la communauté microbienne. En effet, comme pour la hausse du CO₂ lors du premier chapitre, la perte de biodiversité est une conséquence des changements globaux qui affectent nos écosystèmes (Chapin et al 2000 ; Duffy 2003 ; Loreau et al 2002). L'ensemble de la communauté microbienne rhizosphérique réunit des microorganismes symbiotiques et non symbiotiques (van der Heijden et al 2008). L'intérêt des symbiotes pour la nutrition végétale est connu (Wardle et al 2004). L'objectif est donc de mettre en évidence le rôle du reste de la communauté microbienne (hors symbiotes) sur la croissance et la reproduction végétale. Pour cela, trois espèces végétales dépendant plus ou moins de symbiotes ont été utilisées, il s'agit de *Medicago truncatula*, *Brachypodium distachyon* et *Arabidopsis thaliana*. Ces plantes ont été cultivées dans trois types de sol contenant une communauté microbienne plus ou moins diluée. Les symbiotes ont été ajoutés afin que seul le paramètre d'intérêt, le reste de la communauté, soit modifié. De plus, l'ajout de symbiotes permet de mettre en évidence les éventuelles interactions entre les symbiotes et le niveau de diversité de la communauté microbienne interagissant avec la plante. Les coûts et bénéfices pour chaque partenaire, à chaque niveau de diversité de la communauté microbienne, ont été mesurés ainsi que la présence des symbiotes. Concernant les plantes, des traits liés à la croissance et la reproduction ont été mesurés et pour les microorganismes, la densité et la diversité de la communauté microbienne ont été prises en compte. On peut supposer que le gradient de diversité microbienne sera proportionnel au gradient de croissance de la plante (Brussaard et al 2007 ; Loreau 2000) et qu'en présence des symbiotes le rôle du reste de la communauté sera amoindri (Bever et al 2009 ; Morgan et al 2005).

Ce chapitre permettra de répondre aux questions suivantes :

- La composition de la communauté microbienne diluée subit-elle des changements ?
- La dilution de la diversité microbienne entraînant a priori un effet négatif pour la croissance végétale se répercute-t-elle sur la reproduction végétale ?
- La communauté microbienne a-t-elle un rôle accessoire sur la croissance et la reproduction végétale en présence des symbiotes ?

Ce chapitre est destiné à être publié dans la revue *Ecology Letters* en 2013 sous le titre « Diversity decreasing of the rhizospheric microbial community: growth and fitness of three plant species and their symbionts. ». Il est donc présenté sous forme d'un article.

Sommaire

ABSTRACT	130
INTRODUCTION.....	131
MATERIALS AND METHODS.....	137
Experimental design.....	137
Plants and growth conditions	137
Establishment of microbial community with a diversity gradient and biomass recovery	138
Inoculation of symbionts.....	141
Measure of costs and benefits for plant growth and fitness	142
Statistical analysis	143
RESULTS.....	144
Diversity gradient and microbial community characteristics	144
Effect of microbial diversity on symbiotic associations.....	146
Plant growth and fitness in interaction with the microbial diversity gradient.....	148
DISCUSSION	151
Consequence of the recolonization of a sterile soil on bacterial and fungal densities....	151
Effectiveness of microbial diversity dilution through changes in soil chemical properties and microbial composition.....	151
High microbial diversity favours plant-symbiont interactions only for <i>M. truncatula</i> ...	152
Effect of microbial diversity on plant growth and fitness depends on plant species	154
ACKNOWLEDGEMENTS.....	156
REFERENCES	157
SUPPLEMENTAL DATA.....	164

Diversity decreasing of the rhizospheric microbial community: growth and fitness of three plant species and their symbionts

Clémentine Lepinay¹, Céline Faivre-Primot¹, Florence Deau¹, Sébastien Terrat², Thierry Rigaud³, Christophe Salon¹, Pierre-Alain Maron¹ and Christophe Mougel^{1*}

¹INRA, Agroécologie, UMR 1347, INRA/uB/AgroSup, 17 rue Sully, F-21065, Dijon, France

²INRA, Agroécologie, UMR 1347, Plateform GenoSol, 17 rue Sully, F-21065, Dijon, France

³CNRS, Biogeosciences, UMR 6282, CNRS/uB, 6 bd Gabriel, F-21000, Dijon, France

*Correspondence : E-mail: christophe.mougel@dijon.inra.fr, Tel : +33 3 80 69 30 53, Fax : +33 3 80 69 32 24

ABSTRACT

Biodiversity losses in ecosystems become a major concern because of the important ecosystem services provided. Plants sustain all ecosystems through primary production and are directly threatened by diversity erosion and indirectly through their relationships with soil microorganisms. Plants are strongly linked together by trophic exchanges with telluric microorganisms which are decreasing in diversity because of global change. Although the symbionts are essential for the growth of host plants our objective here was to identify the roles of other parts of the microbial community and determine the consequences of rhizospheric microbial diversity dilution on the growth and fitness of three plant species more or less dependent on symbionts, *Medicago truncatula*, *Brachypodium distachyon* and *Arabidopsis thaliana*. Diversity decreasing was achieved by inoculating a sterilized soil with serial dilutions of a suspension from the same non-sterilized soil. Microbial community density, structure and composition were described according to the diversity level. Measurements of plant traits were ranged from growth until seed germination. The results showed that the impact of microbial diversity decreasing on plants depends on their reliance on symbionts. On the whole, *M. truncatula* was negatively affected by diversity decreasing, *B. distachyon* was positively affected and there was no significant effect on *A. thaliana*. These results are of interest to predict the consequences of soil microbial diversity erosion, already affecting our ecosystems, on crop plants, according to their symbiotic interactions.

KEYWORDS

Biodiversity erosion, global change, functional diversity, functional redundancy, ecological insurance, plants-microbes interaction, costs-benefits interaction, symbionts, plant fitness

INTRODUCTION

The consequences of biodiversity losses on ecosystem functioning are now frequently addressed in ecology and biological conservation reviews because of the importance of ecosystem functioning in providing goods and services to promote human well-being.

The commonly studied models of the ecosystemic consequences of biodiversity losses are plants, because of their role in primary production on which all ecosystems are based. To understand the effects on plants of a loss of species richness it is necessary to examine the interactions between plants and other organisms in the ecosystem, particularly in relation to trophic levels. When extinction occurs at one trophic level, this generally results in cascades of extinctions at other trophic levels (Dyer & Letourneau 2003).

Most studies have dealt with the diversity of plant consumers (Duffy 2003 ; Haddad et al 2011 ; Worm et al 2002). It is generally accepted that the removal of insect herbivores leads to an increase in plant biomass (Dyer & Letourneau 2003) but a decrease in plant diversity (Borer et al 2012).

However, relatively few studies have focused on the unseen part of our ecosystem which strongly interacts with plants, i.e. the rhizospheric soil microorganisms. One gram of soil is recognized to contain, on average, up to 10 billion bacteria (Horner-Devine et al 2003) which represent 6000 to 50 000 bacterial species (Curtis et al 2002) and 200 meters of fungal hyphae which represent 1000 species (Leake et al 2004). Soil microorganisms interact with plants at the rhizosphere level. The rhizosphere is the area of soil around roots which is strongly influenced by plant metabolism (Lynch & Whipps 1990).

The relationship between plants and soil microbes is strongly involved in ecosystem services that regulate the functioning of terrestrial systems. Soil microbes play a fundamental role in biogeochemical cycles, either directly or indirectly via their interactions with plants. All nutrient cycles (Nitrogen, Carbon, Phosphorus...) are dependent on microbes to function. For example, microbes are involved in the decomposition, mineralization and immobilization of organic matter which allows carbon recycling (Yuan et al 2012). Some bacteria carry out the transformation of nitrogen through diverse processes such as nitrification and denitrification which enable the nitrogen to circulate in the ecosystem and be used by organisms. Microbes are also responsible for soil health (Brussaard et al 2007). Some microbes are able to accumulate and degrade dissolved heavy metals (cadmium, lead) present in the soil and prevent toxicity for the plant (Kuiper et al 2004 ; Morgan et al 2005).

Plants and soil microorganisms are linked by trophic interactions (Lynch & Whipps 1990). Plants provide microbes with carbon compounds whereas microbes provide plants with nutrients that either they cannot get on their own or in quantities that are too small to satisfy their requirements (van der Heijden et al 2008). The compounds exchanged are costly to produce for each partner but these costs are balanced by the benefits of the interaction. This cost-benefit balance results from a co-evolution between plants and their microbial community (Douglas 2008 ; Lambers et al 2009).

Symbionts are microorganisms which maintain stronger links with plants. Symbionts cannot live without plants and, due to co-evolution of the two partners, have come to ensure essential functions for plant growth. The other part of the microbial community is made up of non-symbiotic organisms able to grow in bulk soil. However, the proximity of plants which represent a source of nutrients is an advantage for them. All these microorganisms play a key role in plant development, growth and reproduction.

Symbiotic microorganisms establish specific structures in association with the plant to facilitate nutrient exchanges. Thus, atmospheric nitrogen (N_2) is assimilated by the plant because of its association with rhizobia. These bacteria fix and transform N_2 into ammonium (Young et al 2003) thus providing 20 % to 80 % of the annual nitrogen supply required by legumes (Denison & Kiers 2004a ; Hobbie & Hobbie 2006). In a somewhat similar interaction, endomycorrhizal fungi supply 75 % of the annual phosphorus requirements of plants (van der Heijden et al 2008).

Non-symbiotic microbes decompose and mineralize organic compounds either present in the soil or released by plants, thereby rendering them directly available for plant assimilation (Loreau 2000). They ensure a better availability and distribution of nutrients (van der Heijden et al 2008). Some microbes are able to store nutrients. The immobilization of nitrogen within the microbial biomass can limit losses of this element in the underground water and help maintain its availability to plants (Brooks et al 1998). Due to the storage role of microbes, a pool of nutrients can accumulate in autumn, at the time of senescence of some plant species, and be maintained during winter until such nutrients can be used by plants in the spring (Bardgett et al 2005).

These associations with symbiotic or non-symbiotic microbes will in turn affect the composition of the plant community. Indeed, nutrient competition is a major structuring factor in plant communities (Ryabov & Blasius 2011). For this reason microbes determine plant competitive aptitude (Scheublin et al 2007 ; Wilson & Hartnett 1998) and modify species interactions. The study by Scheublin et al (2007) on arbuscular mycorrhizal fungi shows that

both legumes and grass benefit from association with the fungus when they grow separately. Nevertheless, when the two plants are in competition, the fungi promote legume growth and grass biomass is reduced by 38 %.

Plant productivity is higher when plants are more or less associated with mutualistic microbes (Gera Hol et al 2010), bacteria (van der Heijden et al 2006a) or fungi (van der Heijden et al 2006b ; Vogelsang et al 2006). Such beneficial interactions stimulate plant defense mechanisms towards parasites (Landa et al 2003 ; van Loon et al 1998) and pathogens (Whipps 2004). Telluric microorganisms can also protect plants against diseases (Eparvier et al 1991).

Moreover, microorganisms enhance plant diversity. For example, van der Heijden et al (2006a) showed that the diversity of plants associated with rhizobia was greater (+34 %) than in plants which did not interact with these bacteria. Similarly, van der Heijden et al (1998) noticed that arbuscular mycorrhizal fungi increased plant diversity in grassland by increasing the competitive ability of mycorrhized species.

All these beneficial microbial functions for plants can be direct, through the secretion of enzymes or growth factors, for example (Dobbelaere et al 1999 ; Patten & Glick 1996), or indirect via the interaction of microbes leading to facilitation (Simard et al 2012). For example, Pivato et al (2009) showed that some bacteria enhance the interaction of plants with their symbiotic fungi.

Through trophic interactions, soil microorganisms regulate the composition, productivity and diversity of plant communities which represent the plant traits involved in ecosystem functioning. Therefore a diversity of functions is ensured by soil microorganisms, which suggests a need for microbial diversity to allow these functions to be carried out.

Species richness is an important point to consider because it reflects the approximate functional diversity (Flynn et al 2009 ; Gamfeldt et al 2008) and allows some essential functions to be redundant (Schmera et al 2012). As several microorganisms are able to ensure the same biological function, the function is not disturbed by a decrease in species richness (Fig 2.1). This was the case in the study by Wertz et al (2006) which showed that a loss of 90 % of the bacterial species did not affect the function of degradation ensured by bacteria as this function was highly redundant. Functional redundancy, also known as ecological insurance, provides resistance against ecosystem disturbances and resilience when the ecosystem is disturbed, thereby contributing to ecosystem stability (Allison & Martiny 2008 ; Baho et al 2012).

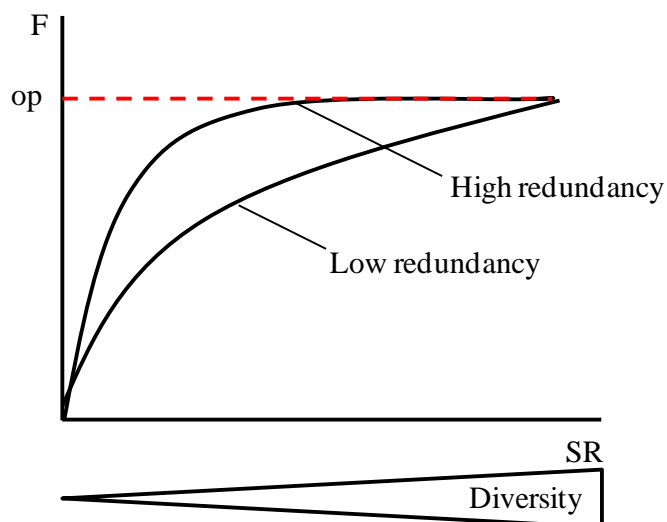


Figure 2.1 The effects of species richness (SR) loss on functions ensured by microbes for plant growth and fitness (F), in a hypothetical community, with high or low functional redundancy (Gamfeldt et al 2008). The dotted line represents the hypothetical optimal plant growth and fitness (op). With high redundancy, when species richness decreases, there is stagnation in the optimal level of functional diversity due to redundancy of the species ensuring these functions. With low redundancy, when species richness decreases, the optimal level of functional diversity falls rapidly because the species ensuring certain functions are few in number and some species are lost so the functions are not ensured.

Gera Hol et al (2010) demonstrated that the whole microbial community was necessary for crop plant species and that some rare species were as essential as redundant species. Although rare species were not redundant in the community and did not play a crucial role in plant nutrition, they indirectly contributed to plant health. Indeed, in their study, some rare microbial species were found to be involved in aboveground and belowground plant defence against shoot and root consumer insects. De Deyn et al (2004) showed that the plant community was more diverse in the presence of all the microbes in a community and that without those microbes the plant community was dominated by grasses. However, Becker et al (2012) showed that species-rich bacterial communities lead to high competition and antagonistic interactions that may reduce community functioning. Nannipieri et al (2003) summarized the role of microbial diversity by hypothesizing that a large number of species is essential for ecosystem functioning in changing environments and that only some species are required under steady conditions.

A decline in microbial diversity could therefore have negative consequences on plant communities and ecosystem functioning in our ecosystems which are subject to global change (Brussaard et al 2007 ; Chapin et al 1997 ; Eisenhauer et al 2012 ; IPCC 2007).

We therefore investigated the interaction between microbial diversity and ecosystem functioning by measuring the effect of a dilution of microbial diversity on microbial composition and related this diversity to plant fitness and growth. In this context it was first essential to clarify which part of the microbial community and therefore which microbial species richness was necessary to ensure functional diversity and allow optimal ecosystem functioning. The hypothesis tested was that a decrease in microbial species richness would affect primary production and the plant's capacity to produce viable offspring. These effects could act directly or indirectly by disturbing beneficial interactions between the plant and its symbionts. To test this hypothesis, three model plant species were used according to their gradient of dependence on symbiotic microorganisms. *Medicago truncatula* is a legume which shares a large synteny with several other legumes (Zhu et al 2005), has a small genome size (Blondon et al 1994) and for which the genetic and genomic resources are known. *Brachypodium distachyon* is a model grass used in recent research on bioenergy and for which the full genome has been sequenced (Hong et al 2012). *Arabidopsis thaliana* is a member of the brassicaceae and is used as a model system to identify genes and determine their functions (Arabidopsis Genome Initiative 2000 ; Metcalf & Mitchell-Olds 2009). *Medicago truncatula* needs two symbionts for optimal growth, a rhizobacterium for nitrogen supply and a mycorrhizal fungus for phosphorus supply. *Brachypodium distachyon* needs only the presence of a mycorrhizal fungus for phosphorus supply. *Arabidopsis thaliana* lives without symbiotic interactions. A constructive approach was used to build a gradient of microbial diversity by inoculating sterilized soil with serially diluted soil suspensions prepared from the native soil. After recolonization of the empty niche in the sterile soil by the microbial community and recovery of the microbial biomass, the above plants were grown in these soils. The same experiment was carried out but symbionts were added for the plants that needed them (*M. truncatula* and *B. distachyon*). This addition of symbionts permitted highlighting of a possible interaction between the microbial community and the symbionts. Certain plant traits which reflected primary production and plant fitness were measured, namely shoot and root biomass (Duffy 2003) and total seed mass and their germination rate, respectively.

Several hypotheses could be put forward to predict the consequences of loss of species richness: (i) the gradient of microbial diversity could be proportional to a gradient of plant growth and (ii) the more the plant interacted with numerous symbionts the more plant growth and fitness would decrease rapidly, the shorter the stagnation in optimal plant growth and fitness (Figure 2.1). Species loss from the microbial community could lead to losses of functions including the function of promoting a beneficial association between the plant and its symbionts essential for plant growth and fitness.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

The effect of microbial diversity dilution on plant growth and fitness was assessed in three plant species, *M. truncatula*, *B. distachyon* and *A. thaliana*. These plants were subjected to three diversity levels and, when necessary, two symbiotic treatments (inoculated with symbionts or not inoculated). There were nine replicates for each symbiotic treatment by diversity level i.e. 54 plants for *M. truncatula*, 54 plants for *B. distachyon* and 27 plants for *A. thaliana*.

Plants and growth conditions

Three plant species differing in their need for symbiotic associations were used. Seeds of *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5 were scarified, surface sterilized, pre-germinated (Mougel et al 2006) and vernalized by a passage at 4 °C for 10 days to accelerate the onset of flowering (Moreau et al 2007). The seeds were placed at 20 °C for 24 h in the dark before being sown. Seeds of *B. distachyon* line Bd21-3 were sterilized by shaking them in 70 % ethanol for 5 min, in a 5.25 % NaClO solution for 10 min, and rinsing for 5 min in sterile demineralized water between each step. *Brachypodium distachyon* seeds were germinated on wattman paper moistened with sterile demineralized water with a 16:8 h light:dark photoperiod and a 25:15 °C light:dark thermoperiod for 12 days. Seeds of *A. thaliana*, wild-type Col-0, were sterilized by shaking them in a mix of NaClO (12.5 %, v/v), sterile demineralized water (37.5 %, v/v) and 95 % ethanol (50 %, v/v) for 20 min and washing three times with 95 % ethanol before drying in a flow chamber. *Arabidopsis thaliana* seeds were germinated on 0.7 % (w/v) water agar plates at 4 °C for 48 h.

The sterilized seeds were then sown in pots containing 10 g of sterile clay balls at the bottom and 850 g (for *M. truncatula* and *B. distachyon*) or 380 g (for *A. thaliana*) of soil with its more or less diversified microbial communities (see below). Seeds were covered with the inoculum of symbionts (see below) and 30 g of sterilized Terragreen (OilDri-US special, Mettman, Germany).

All pots were watered with a nitrogen and phosphorus-limited nutrient solution containing KNO_3 ($8.0 \times 10^{-5} \text{ g l}^{-1}$), K_2HPO_4 ($9.6 \times 10^{-5} \text{ g l}^{-1}$), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 + 4\text{H}_2\text{O}$ ($1.2 \times 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ ($1.0 \times 10^{-3} \text{ g l}^{-1}$), CaCl_2 ($5.7 \times 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), K_2SO_4 ($2.7 \times 10^{-3} \text{ g l}^{-1}$), NaCl ($1.0 \times 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$), and $1.0 \times 10^{-3} \text{ g l}^{-1}$ of a solution containing: H_3BO_3 ($1.92 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$), $\text{MnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ ($1.06 \times 10^{-8} \text{ mol l}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ ($7 \times 10^{-10} \text{ mol l}^{-1}$), CuSO_4 ($3.2 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$),

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ($1 \times 10^{-9} \text{ mol l}^{-1}$), $\text{CoCl}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$ ($8.4 \times 10^{-11} \text{ mol l}^{-1}$) and $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{FeN}_3\text{Na}_2\text{O}_{10}$ ($5 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$). The solution pH was 6. The reference weight of the pots (45 % soil water holding capacity) was monitored by scales and maintained by automatic watering.

The pots were placed in a greenhouse with a 14:10 h light:dark photoperiod and a 22:18 °C light:dark thermoperiod. The amount of photosynthetically active radiation (PAR) at pot height was $170 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for *A. thaliana*, $108 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for *M. truncatula* and $156 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ for *B. distachyon*. *Brachypodium distachyon* also received a brightness compensation with a 20:4 h light:dark photoperiod.

Establishment of microbial community with a diversity gradient and biomass recovery

Soil was collected from Montpellier (Mas d'Imbert, Montpellier, France). This soil is a silt-clay soil poor in mineral nitrogen and rich in organic matter, and harbours symbiotic microbes (Offre et al 2007). The main physicochemical characteristics are: 12.7 % sand, 49.8 % silt, 37 % clay, pH 8.26, 24.3 g kg^{-1} organic matter, 14 g kg^{-1} organic carbon, 1.25 g kg^{-1} mineral nitrogen and 0.035 g kg^{-1} phosphorus.

One part of this soil was sterilized in bags with an internal dose of 45 kGy gamma irradiation (IONISOS, Meylan, France). A cascade of suspensions-dilutions was prepared with fresh non-sterilized soil, by shaking 10 g of soil in 90 ml of sterile demineralized water for 20 min with a flask shaker (Flask shaker SF1, Stuart Scientific, United Kingdom) at $800 \text{ oscillation min}^{-1}$. This step was repeated to obtain the amount required and all suspensions were then mixed to form a homogeneous suspension designated the D0 dilution. This D0 dilution was then serially diluted 10-fold. Three dilutions, D0, D2 and D4 were chosen for the experiment. Bags of sterilized soil were inoculated with the D0, D2 and D4 suspensions to obtain moisture contents of 45 % water holding capacity. The soils inoculated with the dilutions were then incubated at 20 °C for 44 days and regularly mixed.

The microbial biomass was monitored to determine the moment of similar biomass in the three dilutions. Microbiological monitoring was carried out by measuring bacterial density (in CFU, Colony-Forming Units) in tryptic soy agar medium 1/10 and fungal density with malt acid medium, using the medium compositions described in Lepinay et al (2012).

Molecular analyses were also carried out, in addition to microbiological monitoring, after the incubation period of 44 days and before the seeds being sown.

DNA was extracted from soil as previously described by Ranjard et al (2003). The DNA extraction procedure was based on chemical and mechanical techniques. For each sample, the extraction buffer ratio was 4:1 (v/w). Briefly, 2 g of dry soil were mixed with 8 mL of extraction buffer containing 100 mM Tris (pH 8.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 100 mM NaCl and 2 % (wt/vol) sodium dodecyl sulphate. Four g of silica beads 0.1 mm in diameter, 5 g of ceramic beads 1.4 mm in diameter and 8 glass beads 4 mm in diameter were added to this extraction buffer. The mixture was homogenized for 90 s at 4 m s^{-1} in a FastPrep mixer (FastPrep 24, MP biomedical, France). The samples were then incubated for 30 min at 70 °C and centrifuged at 7000 g for 5 min at 20 °C. The collected supernatants were incubated for 10 min on ice with 1/10 volume of 3 M potassium acetate (pH 5.5) and centrifuged at 14 000 g for 5 min at 4 °C. After precipitation in one volume of ice-cold isopropanol, the nucleic acids were washed with 70 % ethanol. The crude DNA obtained was purified by centrifugation through two types of minicolumn. Aliquots (100 μL) of crude DNA extract were loaded onto PVPP (polyvinyl polypyrrolidone) minicolumns (BIORAD, Marne-la-Coquette, France) and centrifuged at 1000 g for 2 min at 10 °C. The collected eluate was then purified with the Geneclean Turbo kit (Q-Biogene, Illkirch, France) following the recommendations of the manufacturer.

DNA was quantified by bacterial and fungal semi-quantitative PCR as described in Plassart et al (2012). Semi-quantitative PCR were performed using an ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with a SYBRGreen detection system. Briefly, DNA was amplified in a total reaction volume of 20 μL , containing 500 ng of T4 gene 32 protein (MP Biomedicals, France) and 10 μL of SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems, France). For bacterial quantification, 1 mM of each primer (341F: 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' and 515R: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCA-3') and 1 ng of template DNA were added to the reaction mixture. The PCR was conducted under the following conditions: 15 min at 95 °C, 35 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, 30 s at 72 °C and 20 s at 80 °C. The 16S rRNA gene from a pure culture of *Pseudomonas aeruginosa* PAO (INRA Dijon collection) was used as standard for the bacterial semi-quantitative PCR assay. For fungal quantification, 1.25 mM of each primer (FR1: 5'-AICCATTCATCGGTAIT-3' and FF390: 5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') and 2.5 ng of template DNA were added to the reaction mixture. The PCR was conducted under the following conditions: 10 min at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 50 °C and 60 s at 70 °C. Amplified DNA from a pure culture of *Fusarium oxysporum* 47 (INRA Dijon collection) was used as a fungal standard.

After the incubation period of 44 days, soil chemical measurements were also done to see if the diversity gradient had affected the composition of the soil.

Moreover, the diversities of the microbial communities for the three dilutions, D0, D2 and D4 were determined by pyrosequencing 454, a molecular technique allowing the rapid and massive production of targeted DNA sequences (Maron et al 2011). For bacteria, a 16S rRNA gene fragment was amplified using the primers F479 (5'-CAGCMGCGYGCNGTAANAC-3') and R888 (5'-CCGYCAATTCMTTTRAGT-3'). For fungi, a 18S rRNA gene fragment was amplified using the primers FR1 (5'-AICCATTC AATCGGTAIT-3') and FF390 (5'-CGATAACGAACGAGACCT-3') developed by Vainio et Hantula (2000). Concerning bacteria, for each sample (root or rhizosphere soil), 5ng of DNA were used for a 25µl PCR reaction conducted under the following conditions: 94°C for 2 min, 35 cycles of 30 s at 94°C (denaturation), 52°C for 30 s (annealing) and 72°C for 1 min (extension), followed by 7 min at 72°C. Concerning fungi, 5ng of DNA were used for a 25µl PCR reaction conducted under the following conditions: 94°C for 3 min, 35 cycles of 30 s at 94°C, 52°C for 1 min and 72°C for 1 min, followed by 5 min at 72°C. PCR products were purified using a MinElute kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and quantified using the PicoGreen kit (Molecular Probes, Paris, France). A second PCR of 9 cycles conducted under similar PCR conditions was then performed with purified PCR products and ten base pair MID ('Multiplex Identifier') were added to the primers at 5' position to identify each sample and avoid PCR biases. Finally, the PCR products were purified and quantified as previously described. Pyrosequencing was then carried out on a Genome sequencer GsFLX 454 Titanium (Roche diagnostics, Genoscreen).

The data obtained were subjected to bioinformatic analyses as described in Terrat et al (2011) following several steps. In summary, the quality of the sequences obtained was first checked for the presence or not of unknown bases (ns). The sequences were then sorted according to the MID sequences. To efficiently compare the datasets and avoid biased community comparisons, those raw datasets which had a large number of reads were reduced by random selection to be near the lowest dataset. Raw reads were then filtered and deleted if (a) the exact primer was not found at the beginning of the sequence, (b) sequences contained any ambiguity (ns), or if (c) their length was below 350 bases for 16S rDNA and 300 bases for 18S rDNA. A Perl program was applied in a strict dereplication step, aimed to compare and detect identical sequences and measure the occurrence of each sequence (i.e. clustering of strictly identical sequences). The dereplicated reads were then aligned and clustered into molecular operational taxonomic units (MOTU). Another filtering step was then applied to

eliminate potential sources of errors in the number of MOTU (PCR chimeras, sequencing errors). Sequences with only one or non clustered sequences, known as single-singletons, were checked by comparison with the databases to remove erroneous sequences which might lead to overestimation of the number of MOTU. Finally, the obtained high-quality sequences were used for taxonomy-based analyses. The Naïve Bayesian classifier, from the RDP project for bacterial sequences, and Silva for fungal sequences, were used for these analyses (confidence threshold of 80 %). Diversity indices were calculated as described by Terrat et al (2011). The total number of MOTUs, and the Shannon and Evenness indices were used as indicators of microbial richness, diversity and stability, respectively.

Inoculation of symbionts

Two symbionts were supplied to the plants after the incubation period and after the seeds being sown: a bacterium, *Sinorhizobium medicae* strain STM 5484 and a fungus, *Glomus intraradices* BEG140.

The *S. medicae* strain was prepared from two successive two-day precultures on liquid yeast extract-mannitol (YEM) medium (Vincent 1970) incubated at 28 °C and shaken at 120 rpm. The first preculture was formed by the strain in 10 ml of YEM medium. The second consisted of 10 ml of the first preculture in 500 ml of YEM medium. Ten ml of the second preculture were then centrifuged at 6000 g for 15 min at 15 °C. The supernatant was removed and the pellet was washed twice with sterile demineralized water under the same conditions of centrifugation as previously. The pellet was mixed with 5 ml of sterile demineralized water and the strain concentration was measured by spreading 100 µl of this suspension on solid YEM medium to bring the strain to a concentration of 1.10^4 CFU g⁻¹ of soil.

Glomus intraradices was provided as the commercial product Symbivit® (INOCULUMplus, Dijon, France) which consists of a mix of six mycorrhizal fungi species (*Glomus intraradices* BEG140, *G. mosseae* BEG95, *G. etunicatum* BEG92, *G. claroideum* BEG96, *G. microaggregatum* BEG56, and *G. geosporum* BEG199), clay carriers, ingredients supporting mycorrhiza (humates, ground minerals, extracts from sea organisms) and granules of a water-retaining gel. Symbivit® was inoculated so as to have 1000 fungal propagules per seed.

Both symbionts were supplied to the *M. truncatula* seeds but only the fungus *G. intraradices* was supplied to *B. distachyon*.

At the end of experiment, when plants were analysed, the nodulation intensity, which reflected the intensity of colonization of *M. truncatula* roots by its symbiont, *S. medicae*, was measured by counting the number of nodules attached to the roots.

The efficiency of the mycorrhizal association with *M. truncatula* and *B. distachyon* was also determined by randomly sampling 30 root fragments, 1.5 cm in length, from each of the 54 roots of the two plants. These root fragments of *M. truncatula* and *B. distachyon* were stained with 1 % methyl blue by respective passages for 40 and 20 min in 10 % potassium hydroxide at 60 °C, then by rapid passages in demineralized water, 1 % methyl blue and three washes with 90 % lactic acid. The fragments were wiped between each step and finally observed between microscope slides and cover slips in 90 % lactic acid. The intensity of root mycorrhizal colonization was determined as in Trouvelot et al (1986) using MYCOCALC software (<http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg/download.html>) and expressed as frequency (F %), intensity (M %) of colonization and arbuscular abundance (A %).

Measure of costs and benefits for plant growth and fitness

The reference point selected for the end of the experiment and the time of plant analysis was the stage where the seeds were mature. This reference point differed according to the plant species and its developmental stages. Thus, seeds of *M. truncatula*, *B. distachyon* and *A. thaliana* were mature and analyzed after 83, 114 and 76 days, respectively.

The effects of the diversity gradient on plant growth were determined by measuring both shoot and root biomass. For *M. truncatula* and *B. distachyon*, the shoot dry biomass was obtained by drying the shoots at 80 °C for 72 h. For *A. thaliana*, the rosette size was measured instead of shoot biomass because seed production results in destruction of the leaves. The fresh root biomass was measured for each of the three plants.

Plant fitness was assessed by determining the total mass of seeds, (to get an idea of the number of seeds), and the germination rate of these seeds for each plant species. The germination rates were determined by growing seeds of each species under the same conditions as the plants which produced them (see Plants and growth conditions) but without the sterilization steps. Germinated seeds were counted and removed after 7 days. Final germination rates were determined after 14 days.

Statistical analysis

Normality and equality of variances were tested by Shapiro-Wilk and Bartlett tests respectively. When necessary, the data were log-transformed to achieve normality. Data expressed as percentages (germination rates and parameters resulting from the mycorrhization analyses) were subjected to arcsine square root transformation and the nodulation intensity data, being counts, were subjected to square root transformation (Legendre & Legendre 1998). Soil physicochemical characteristics and the results of quantitative PCR comparing the three diversity levels were analysed with ANOVAs and the Tukey-Kramer HSD a posteriori test. The data for symbionts, with the two conditions of addition (inoculated with symbionts or not) were analysed separately for *M. truncatula* and *B. distachyon*, with ANOVAs and the Tukey-Kramer HSD a posteriori test. *Medicago truncatula* and *B. distachyon* data were analysed by linear models with diversity level, symbionts addition and their interactions as factors. If the diversity level or the interaction between diversity level and symbionts addition was significant, the Tukey-Kramer HSD a posteriori test was performed, whereas a Student's t-test was performed if only the symbionts addition was significant. However, there was no symbionts addition factor for *A. thaliana* so the data were analysed with ANOVAs and a Tukey-Kramer HSD a posteriori test. Diversity indices and numbers of reads and OTUs were compared between the three diversity dilutions with ANOVAs and a Tukey-Kramer HSD a posteriori test. All values presented in the text are means \pm s.e.m. The different groups after a posteriori tests are indicated by different letters in the tables. The analyses were performed using the statistical software JMP 5.0.1. with an alpha level of 0.05.

RESULTS

Diversity gradient and microbial community characteristics

Microbial densities were compared after incubation to ensure that the plants would be sown in three soils differing in their microbial diversity but with a similar microbial biomass (Table 2.1). This objective was reached for bacteria because the numbers of 16S copies g⁻¹ soil were not significantly different, but for fungi the number of 18S copies g⁻¹ soil decreased with the dilution of diversity. There were significantly fewer fungi in D4 than in D0, the fungal density in D2 being intermediary.

Table 2.1 Bacterial and fungal densities (Number of 16S or 18S copies g⁻¹ soil) after 44 days of incubation in diluted soils

Variable	Mean values (\pm SEM) for the three microbial diversity dilutions			d.f.	F	P
	D0	D2	D4			
Bacteria (Number of 16S copies g ⁻¹ soil)	5.61E+10 \pm 2.38E+10	1.48E+10 \pm 1.44E+09	1.54E+10 \pm 3.60E+09	2	2.90	0.07
Fungi (Number of 18S copies g ⁻¹ soil)	1.79E+10 \pm 2.05E+09 ^a	1.28E+10 \pm 2.75E+09 ^{ab}	7.14E+09 \pm 1.42E+09 ^b	2	6.29	0.0064

For all parameters: n = 3

After 44 days of incubation, the soil chemical properties of the three dilutions of microbial diversity differed in the molecular form of the nitrogen present and in their pH. In D0 and D2, nitrogen was mainly in the form of nitrates and in D4 as ammonium (Table 2.2). The amount of nitrate was much smaller in D4 and the amount of ammonium much smaller in D0 and D2. The pH showed a small but statistically significant decrease in D4 reflecting a weak acidification in D0 and D2. The amount of potassium was slightly lower in D4 than in D0 and D2. However, the organic matter, organic carbon, total mineral nitrogen and phosphorus contents did not differ between the soils (Table 2.2).

Table 2.2 Soil chemical characteristics in diluted soils after 44 days of incubation

Variable	Mean values (\pm SEM) for the three microbial diversity dilutions			d.f.	F	P
	D0	D2	D4			
Organic matter (g kg ⁻¹)	22.8 \pm 1.0	22.0 \pm 0.5	22.6 \pm 0.9	2	0.243	0.79
Organic carbon (g kg ⁻¹)	13.2 \pm 0.6	12.7 \pm 0.3	13.1 \pm 0.6	2	0.244	0.79
Total mineral nitrogen (g kg ⁻¹)	1.13 \pm 0.01	1.12 \pm 0.00	1.11 \pm 0.00	2	4.20	0.07
Nitrate (NO ₃) (mg kg ⁻¹)	76.03 \pm 1.37 a	69.70 \pm 2.50 a	7.15 \pm 1.04 b	2	472.18	<.0001
Ammonium (NH ₄) (mg kg ⁻¹)	7.41 \pm 0.33 b	8.94 \pm 0.67 b	46.07 \pm 0.28 a	2	2270.96	<.0001
Phosphorus (g kg ⁻¹)	0.023 \pm 0.001	0.023 \pm 0.001	0.022 \pm 0.000	2	0.78	0.50
Potassium (cmol+ kg ⁻¹)	0.574 \pm 0.004 a	0.570 \pm 0.001 a	0.548 \pm 0.003 b	2	25.57	0.0012
pH	8.37 \pm 0.01 b	8.40 \pm 0.03 b	8.57 \pm 0.01 a	2	38.78	0.0004

The effectiveness of our diversity dilutions was confirmed by the analysis of microbial community composition (Table 2.3). There was no statistically significant difference in the number of reads for bacteria and fungi between the three diversity dilutions. However, the diversity of the bacterial and fungal communities was affected. This result was clear for bacteria because the decrease in number of OTUs with dilution was statistically significant (Table 2.3a). Nevertheless, the difference in number of fungal OTUs between the dilutions was not statistically significant (Table 2.3b). The Shannon diversity index, which was lower in D4 and higher in D0, confirmed that the bacterial and fungal diversities were lower in D4 and higher in D0. Although the bacterial diversity was slightly lower in D2, it was not distinguishable from D0. Similarly, the bacterial and fungal Evenness indices were lower in D4 and higher in D0.

Table 2.3 Number of reads, OTUs and diversity indices of the three diversity dilutions for the bacterial and fungal communities

Source of variation		Mean values (\pm SEM) for the three microbial diversity dilutions			d.f.	F	P
		D0	D2	D4			
Bacteria (16S)							
	Number of reads	33731.7 (\pm 2104.7)	37014.7 (\pm 1156.4)	38011 (\pm 308)	2	1.91	0.2417
	Number of OTUs	4812.33 (\pm 294.37) a	4477 (\pm 204.18) ab	3313 (\pm 256) b	2	7.85	0.0287
	Shannon	5.98 (\pm 0.10) a	5.72 (\pm 0.07) a	5.16 (\pm 0.20) b	2	11.84	0.0127
	Evenness	0.71 (\pm 0.009) a	0.68 (\pm 0.006) ab	0.64 (\pm 0.019) b	2	10.34	0.0167
Fungi (18S)							
	Number of reads	42548.7 (\pm 271.3)	42950.3 (\pm 507.6)	39268 (\pm 2767)	2	2.66	0.1632
	Number of OTUs	826.33 (\pm 57.01)	684 (\pm 40.84)	648 (\pm 88)	2	2.65	0.1645
	Shannon	3.48 (\pm 0.11) a	3.09 (\pm 0.08) ab	2.93 (\pm 0.07) b	2	8.6	0.0241
	Evenness	0.52 (\pm 0.011) a	0.47 (\pm 0.009) b	0.45 (\pm 0.001) b	2	12.13	0.0121

More precisely, taxonomic analyses at the genus level revealed that some genera were characteristic of the dilution considered (Supplemental data, Fig 2.S3). Some bacterial genera were not present in D0 but appeared in D2 or only in D4, such as *Dyadobacter* and *Chryseobacterium* respectively, for example. Some genera, like *Adhaeribacter*, disappeared in D4. Others, such as *Pseudomonas* and *Pedobacter*, were present in all three dilutions but increased with the dilution of diversity. In contrast, unknown bacteria were increasingly represented in D0. Finally, the *Devosia* and *Massilia* genera were highly abundant in D2 and less present in D0 and D4. The same trends were apparent for unknown fungi that increased in D0. Some fungal genera, such as *Mortierella* and *Chaetomium*, were most abundant in D4, whereas others, like *Chalara*, were no longer detected in D4. There were some genera, such as *Penicillium* or *Rhizopus*, that were abundant in D2 and decreased in D0 and D4.

Effect of microbial diversity on symbiotic associations

Medicago truncatula and *B. distachyon* depend on their symbionts to achieve good growth and fitness, so the consequences of diversity dilution on the symbionts needed to be considered before the effect of microbial diversity on the plants was studied (Table 2.4). The effect of microbial diversity was investigated by adding similar quantities of symbionts to each diversity level (Table 2.4a,c). It is important to note that the symbiotic parameters, measured at the end of the experiment, reflect the colonization of plants by their symbionts, and permit visualization of the effect of microbial diversity on the efficiency of the symbiotic association with plants. Such analyses reflect how this association evolved in the three different contexts of diversity.

Concerning mycorrhization, the frequency (F %) and arbuscular abundance (A %) of mycorrhizal colonization were weaker for *M. truncatula* with a low microbial diversity (Table 2.4a); the intensity of colonization (M %) was the only parameter not affected by the diversity level. For *B. distachyon*, the measured parameters were not affected by the diversity level (Table 2.4c). A higher diversity led, on the whole, to a better interaction between *M. truncatula* and its symbionts (Table 2.4a) contrary to *B. distachyon* which interacted in the same way with its mycorrhizal symbiont regardless of the diversity of the microbial community in the rhizosphere.

A similar trend was observed for the intensity of nodulation in *M. truncatula* (Table 2.4a), the intensity diminishing with the decrease in microbial diversity.

In conclusion, *M. truncatula* seemed to exhibit a better interaction with its symbionts, (*S. medicae* and *Glomus* species), when the diversity of the rhizospheric community was high.

The same symbiotic parameters were examined at the end of the experiment to determine the plant-symbiont interactions when symbionts were not added but were diluted with the rest of the microbial community (Table 2.4b,d).

A strong decrease in all mycorrhizal parameters was consistently observed for *M. truncatula* (Table 2.4b) and *B. distachyon* (Table 2.4d) with decreased microbial diversity, except for arbuscular abundance (A %) for *B. distachyon* where the decrease was not statistically significant.

It is interesting to note that, for *M. truncatula*, nodulation was the only parameter that did not decrease according to diversity and that did not differ significantly with the level of diversity (Table 2.4b).

At the end of the experiment, when the symbionts were diluted with the rest of the microbial community, the biomass of the mycorrhizal partner was not restored and the symbionts dilution was maintained. However, the biomass of the bacterial partner responsible for nodulation was recovered, regardless of the diversity level.

Table 2.4 Measure of symbiotic associations for *M. truncatula* and *B. distachyon* with or without symbionts addition

Source of variation	Mean values (\pm SEM) for the three microbial diversity dilutions			d.f.	F	P
	D0	D2	D4			
<i>Medicago truncatula</i>						
(a) symbionts addition						
F %	73.33 \pm 3.24 a	53.95 \pm 8.18 ab	48.72 \pm 8.35 b	2	3.44	0.049
M %	35.68 \pm 4.61	26.78 \pm 4.82	20.09 \pm 6.28	2	2.68	0.09
A %	26.43 \pm 4.61 a	17.14 \pm 3.83 ab	12.47 \pm 4.24 b	2	3.26	0.056
Nod	29.89 \pm 3.01 a	23 \pm 5.44 ab	10.78 \pm 3.40 b	2	6.03	0.008
(b) without symbionts addition						
F %	70.68 \pm 3.29 a	12.96 \pm 3.62 b	2.22 \pm 0.96 c	2	83.49	<.0001
M %	38.13 \pm 2.31 a	5.19 \pm 1.94 b	0.99 \pm 0.66 b	2	76.81	<.0001
A %	31.03 \pm 2.26 a	4.28 \pm 1.26 b	1.66 \pm 0.94 b	2	60.49	<.0001
Nod	14.22 \pm 4.68	9.56 \pm 3.02	9.89 \pm 1.96	2	0.13	0.88
<i>Brachypodium distachyon</i>						
(c) symbiont addition						
F %	89.52 \pm 4.74	81.25 \pm 7.26	78.89 \pm 7.97	2	0.41	0.67
M %	42.99 \pm 7.82	31.78 \pm 6.59	36.91 \pm 8.38	2	0.46	0.64
A %	13.35 \pm 3.21	13.25 \pm 4.61	11.51 \pm 3.25	2	0.11	0.90
(d) without symbiont addition						
F %	45.83 \pm 15.75 a	12.92 \pm 7.62 b	2.96 \pm 1.52 b	2	6.55	0.006
M %	18.11 \pm 9.92 a	2.24 \pm 1.65 ab	0.03 \pm 0.02 b	2	4.56	0.022
A %	13.55 \pm 8.48	2.52 \pm 1.29	0.003 \pm 0.003	2	1.36	0.29

Plant growth and fitness in interaction with the microbial diversity gradient

The known effects of symbionts on plants were confirmed by determining the effect of symbionts alone on *M. truncatula* and *B. distachyon* (Table 2.5). Regardless of the diversity level, the shoot dry biomass and the total seed mass of *M. truncatula* were greater when the plant interacted with its symbionts. Contrary to expectations, the symbiont alone had no positive effect on *B. distachyon*.

When the impact of microbial diversity on growth parameters was examined (Table 2.5a, b), the shoot dry biomass of *M. truncatula* was higher in D0 than in the other dilutions, regardless of symbiont addition (D0: 5.10 ± 0.11 , D2: 4.53 ± 0.12 , D4: 4.40 ± 0.10). However, the shoot dry biomass of *B. distachyon* and the rosette size of *A. thaliana* were not significantly affected by microbial community diversity.

Table 2.5 Effects of diversity level (D0, D2, D4), symbionts addition (inoculated or not inoculated with symbionts) and their interaction on growth and fitness of *M. truncatula*, *B. distachyon* and *A. thaliana*

Variables	F-value (<i>P</i>) for the four plant traits linked to plant growth and fitness			
	(a) Shoot dry biomass (g) / Rosette size (cm)†	(b) Root fresh biomass (g)	(c) Total seed mass (g)	(d) Germination rate (%)
<i>Medicago truncatula</i>				
Diversity level	13.33 (<.0001)	8.38 (0.0008)	8.99 (0.0005)	0.70 (0.50)
Symbionts addition	11.77 (0.0012)	8.23 (0.0061)	36.08 (<.0001)	0.10 (0.76)
Diversity level & Symbionts addition	0.50 (0.61)	4.25 (0.020)	0.24 (0.79)	0.59 (0.56)
<i>Brachypodium distachyon</i>				
Diversity level	2.58 (0.09)	0.46 (0.63)	0.14 (0.87)	2.56 (0.09)
Symbiont addition	0.40 (0.53)	0.41 (0.53)	0.49 (0.49)	2.64 (0.11)
Diversity level & Symbiont addition	2.63 (0.08)	3.99 (0.026)	0.88 (0.42)	2.53 (0.09)
<i>Arabidopsis thaliana</i> †				
Diversity level*	0.95 (0.40)	1.39 (0.27)	0.99 (0.39)	2.52 (0.10)

* *t*-value (*P*)

The root fresh biomasses of *M. truncatula* and *B. distachyon* were altered by the diversity level and by symbiont addition (Fig 2.2a,b). When the symbionts were not inoculated, and were thus diluted with the rest of the microbial community, the root biomass of *M. truncatula* was not significantly different between the diversity levels (Fig 2.2a). In the same conditions of non inoculation, the root biomass of *B. distachyon* increased with the decrease in microbial diversity (Fig 2.2b). Different results were obtained when the symbionts were inoculated. With its symbionts, the root biomass of *M. truncatula* increased with an increase in microbial diversity (Fig 2.2a) and the root biomass of *B. distachyon* with its symbiont remained relatively constant with diversity dilution (Fig 2.2b). The root biomass of *A. thaliana* was not affected by the diversity level (Table 2.5b).

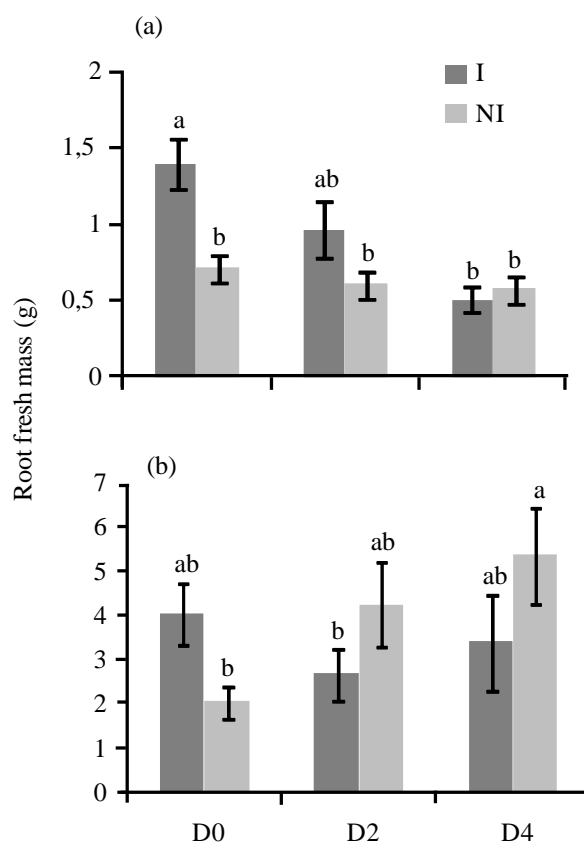


Figure 2.2 Root fresh biomass of (a) *M. truncatula* and (b) *B. distachyon* as a function of symbiont addition (I: inoculated with symbionts or NI: Not Inoculated with symbionts) and diversity level (D0, D2, D4). Standard errors are represented by vertical bars. Groups significantly different after a Tukey-Kramer's HSD test are indicated by different letters ($\alpha = 0.05$).

Concerning plant fitness (Table 2.5c,d), the only apparent effect was for *M. truncatula* which had a higher total seed mass at D0 than at the other diversity levels regardless of symbiont addition (Table 2.5c). The number of seeds was also counted for *M. truncatula* (data not shown) and showed the same result with more seeds at D0. Consequently, *M. truncatula* produced more seeds when microbial diversity was high that was reflected by the total seed mass (D0: 0.32 ± 0.02 , D2: 0.22 ± 0.03 , D4: 0.21 ± 0.03). Such an effect would be an advantage for the plant if these seeds had a better or similar germination rate. Here, the germination rates of *M. truncatula* seeds did not differ significantly with microbial diversity (Table 2.5d). This beneficial effect on *M. truncatula* fitness was not found for *B. distachyon* and *A. thaliana*, for which neither diversity nor the symbiont (for *B. distachyon*) had any effect on total seed mass or germination rate (Table 2.5d).

DISCUSSION

Consequence of the recolonization of a sterile soil on bacterial and fungal densities

Before the effect of microbial diversity dilution can be investigated in an experiment involving the recolonization of a sterile soil, the rhizospheric niche needs to be entirely filled. The potential impacts of the microorganisms on the plants have to result from the dilution of microbial diversity but not from the dilution of its biomass. The bacterial and fungal densities in the inoculated soils were therefore checked after the incubation period. Bacteria attained the holding capacity of soil but this was not the case for fungi. The fungal densities decreased consistently with the dilution of diversity. Nevertheless, the fungal densities were also measured over time (Supplemental data, Fig 2.S1) and reached a zone of stagnation in D0 and D4, for which the densities were statistically different. They did not become similar even after a longer incubation time. In all ecosystems, bacteria are first to colonize the environment (Whitton & Potts 2012) whereas fungi need more time to become established and stabilize. There are generally fewer fungi in soil than bacteria because it is less easy for fungi to colonize an environment. Moreover, fungal hyphae are fragile and may have been damaged by the shaking process used to prepare the soil suspensions, even though it was gentle. The densities attained by fungi were therefore considered as their maximal densities at the holding capacity in each dilution. The rhizospheric niches were considered as filled and the diversity of the microbial community could then be examined.

Effectiveness of microbial diversity dilution through changes in soil chemical properties and microbial composition

The chemical properties that diverged for nitrogen and pH seemed consistent with a dilution of diversity. The nitrogen cycle depends on ammonifying bacteria which transform mineralized soil organic matter into ammonium and nitrifying bacteria which transform ammonium into nitrates (Vitousek et al 1997b). The chemical data obtained showed that ammonifying bacteria were present and creating a pool of ammonium in all three dilutions. In D0 and D2 a large proportion of the ammonium was transformed into nitrate by the nitrogen cycle. Nitrification is known to acidify the medium (Phillipot et al 2007) which is thus consistent with the slow reduction of the pH observed in D0 and D2. However in D4, the nitrogen remained in the form of an ammonium pool and only a small part of this pool was transformed into nitrates. Consequently, some nitrifying bacteria were lost following the dilution of diversity. The decreased potassium in D4 suggests that some of the microbes

responsible for soil potassium extraction were also lost. Such results showed that our experiment of dilution of the microbial diversity seemed to be efficient.

The absence of difference between the number of reads in the three diversity dilutions for both bacteria and fungi indicated that the pyrosequencing technique had been well performed without technical bias. Moreover, the decrease in number of OTUs for the bacterial community confirmed the dilution of the bacterial diversity, which was not observed for the fungal community. Nevertheless, the Shannon indices for bacteria and fungi showed that the diversity of both communities decreased with the dilutions. Examination of the number of taxonomic groups at the genus level revealed a difference between the three dilutions (Supplemental data, Fig 2.S3) which could be explained by species gains or losses or by species rearrangements. Some genera disappeared from the bacterial and fungal communities in the D4 dilution. These genera were probably already scarce in the community and were removed by dilution. The same trend was observed for the unknown bacterial and fungal genera. The unknown groups, highly abundant in D0, decreased with diversity dilution. All these genera were either underrepresented and disappeared, or were too few to compete and survive with the remaining species. In contrast, some genera became more abundant as the bacterial or fungal diversity was diluted and some bacterial genera only appeared in D4. These genera benefited from the decreased diversity maybe because they were competing with other genera in D0 and were able to grow when these competitive genera were no longer present in D4. Finally, some bacterial and fungal genera benefited when the diversity of the community was intermediate. This phenomenon can be explained by the observed rearrangements of species and competitive links between species (Supplemental data, Fig 2.S3,A2,B2). The bacterial and fungal Evenness indices were smaller in D4 than in D0, which is characteristic of a decrease in diversity. Indeed, this meant that there were more taxonomic groups with few individuals in D0 than in D4 where there were fewer taxonomic groups, each with many individuals (Hill 1973 ; Stirling & Wilsey 2001).

High microbial diversity favours plant-symbiont interactions only for *M. truncatula*

A high level of microbial diversity enhanced both the frequency and arbuscular abundance of the mycorrhizal symbiont of *M. truncatula*. Strangely, although *B. distachyon* had a similar mycorrhizal symbiont to that of *M. truncatula*, the association of *B. distachyon* with its symbiotic fungi was unaffected by microbial diversity. *Brachypodium distachyon* interacted strongly with its mycorrhizal symbiont regardless of the diversity level of the microbial community. Two hypotheses could be proposed. First hypothesis: *M. truncatula* had another

symbiont, *S. medicae*, and the microbial diversity enhanced its interaction with the plant leading to a cascade response that included nodulation. For *M. truncatula*, a high level of microbial diversity would promote nodulation which in turn would enhance mycorrhization. In support of this hypothesis, Frey-Klett et al (2007) showed that some bacteria produced growth factor that promoted the germination of fungal spores and mycelial growth. Furthermore, a low diversity of the microbial community, which would lead to decreased nodulation, (i.e., provision of the plant with nitrogen), could result in nitrogen deficiency for the plant. This could lead to competition between *M. truncatula* and its mycorrhizal symbiont for this element (Veresoglou et al 2011). Second hypothesis: different microorganisms would promote the interaction between plants and mycorrhizal symbionts in *B. distachyon* and *M. truncatula*. In this case the dilution of microbial diversity would specifically involve a loss of those microbes enhancing the interaction between *M. truncatula* and its mycorrhizal symbiont. Thus, the microbial species that promoted interactions between *B. distachyon* and its mycorrhizal symbiont would be more redundant than those of *M. truncatula*.

When the symbionts were not inoculated but only diluted within the rest of the microbial community, the mycorrhizal parameters did not, on the whole, recover their high levels of interaction with the plants in D2 and D4. This was consistent with the difficulties associated with fungal colonization. Noteworthy, the only symbiotic parameter which regained the level of interaction existing between *M. truncatula* and *S. medicae* in D0, was nodulation. This result suggests that *S. medicae* was more competitive than other microorganisms and confirmed the essential role of nodulation evoked in the first hypothesis. For *M. truncatula*, this study confirms the well known positive effect of symbionts on plants. The symbionts were beneficial for shoot growth and fitness by allowing the plant to produce more seeds regardless of the microbial diversity level. For *B. distachyon*, there was no advantage for the plant to interact with its symbionts, in terms of growth enhancement or fitness, and regardless of the diversity level, even though there were strong interactions between the two partners. Presumably the microbes responsible for these interactions were not redundant. This does not support the second hypothesis. Indeed, some studies showed that essential microbial functions are generally redundant because they promote essential roles for ecosystems functioning (Duffy 2003). For example decomposers are highly redundant in ecosystems because they are at the bottom of the trophic chain (Nannipieri et al 2003). Thus the most likely hypothesis was the first, i.e., that the symbiotic bacteria of *M. truncatula* promoted the establishment of mycorrhizal symbionts. Bonfante & Anca (2009) showed that

many bacteria are able to assist in the establishment of mycorrhiza and often form a tripartite association with plants and mycorrhizal fungi.

Effect of microbial diversity on plant growth and fitness depends on plant species

The effects of microbial community diversity on growth parameters varied according to the plant considered. The high level of diversity in D0 led to a higher shoot biomass for *M. truncatula* irrespective of whether the plant was inoculated with its symbionts or not. When *M. truncatula* was inoculated, lowering the diversity level decreased the symbiotic associations and shoot biomass. When *M. truncatula* was not inoculated, the level of nodulation was low, whatever the dilution. This, added to the decrease in mycorrhizal association in D2 and D4, presumably resulted in a carbon cost for the plant which decreased its shoot biomass. Consequently, the interaction of *M. truncatula* with a diversified microbial community always implies the presence of its symbionts. As previously described, symbionts are not essential for *B. distachyon* and *A. thaliana*, which could explain why there was no effect on shoot biomass and rosette size, respectively, when the microbial diversity was modified.

The only plant trait that was affected by changes in microbial diversity was plant root biomass. This trait reflects the exchange area between plants and soil microorganisms. Without symbionts inoculation, the root biomass remained constant when both the microbial diversity and the association of *M. truncatula* with mycorrhiza decreased. This could be due to the low level of nodulation, which remained constant throughout the different treatments. Conversely, when symbionts were inoculated a positive interaction with a high level of diversity was demonstrated, again expressing the essential role of symbionts for *M. truncatula*. The clear absence of a beneficial effect of mycorrhizal symbionts on *B. distachyon* was apparent from the root biomass. When *B. distachyon* was inoculated with its symbiont the root biomass seemed to be regulated by the mycorrhizal symbiont and remained constant over time regardless of the diversity level. However, when mycorrhization was very weak and the microbial community little diversified, the root biomass was higher. The interaction with fungi seemed to represent a cost for *B. distachyon*. Thus, it is possible that *B. distachyon* produced more roots in order to search for nutrients in the medium and avoid the cost of symbiosis with fungi. Another explanation is that there were a lot of microbes in D0 and that competition between these microbes reduced the benefit for *B. distachyon* to interact with a diversified community (Becker et al 2012). Thus, in D4, there would be less competition and

only the redundant species needed to ensure essential functions for the plant would be present. Roots of *A. thaliana* were not affected by the diversity of the microbial community.

Finally, microbial diversity did not have any impact on the fitness of *B. distachyon* and *A. thaliana*. Regardless of the diversity level, all the microbial functions were ensured and the total mass of seeds and their germination rates were not affected. *Medicago truncatula* is, nevertheless, strongly dependent on its symbionts as regards fitness. Through interaction with a diversified microbial community *M. truncatula* was able to produce more seeds, which could represent an evolutionary advantage.

This experiment showed that the preservation of microbial diversity for ecosystem functioning depends on the plant considered. The more a plant interacts with several symbionts the more it loses its capacity to ensure its own growth and fitness (Saikkonen et al 2004) and the more it depends on its symbionts. This is the case of *M. truncatula*. Microbial species richness is thus of direct importance for the symbionts and of indirect importance for the plant. However, the positive effect of *Glomus* species has been demonstrated for *B. distachyon* (Hong et al 2012) but in this study the interaction became costly for the plant. Furthermore, microbial species richness also seemed to represent a cost for *B. distachyon*. De Deyn et al (2004) showed that in a sterilized soil the plant community was dominated by grasses even without fertilization because they needed fewer nutrients. *Arabidopsis thaliana* did not require a diversified microbial community. This plant can ensure its own growth and fitness with few microbes and the few essential microbial functions remain in the soil after dilution of the microbial diversity.

Therefore, the composition of rhizospheric microbial species remaining after a diversity decreasing and the strength of microbial interactions with plants need to be considered when predicting the effects of a loss of microbial species richness on ecosystem functioning.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Frank Zenk and Florence Strbick for their assistance with plant experiments, Christian Jeudy and Delphine Moreau for providing the composition of nutrient solution and Brigitte Brunel for supplying the *S. medicae* strain.

REFERENCES

- Allison, S.D. & Martiny, J.B.H. (2008) Resistance , resilience , and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11512-11519.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796-815.
- Baho, D.L., Peter, H. & Tranvik, L.J. (2012) Resistance and resilience of microbial communities--temporal and spatial insurance against perturbations. *Environmental Microbiology*, 14, 2283-2292.
- Bardgett, R.D., Bowman, W.D., Kaufmann, R. & Schmidt, S.K. (2005) Linking aboveground and belowground communities: a temporal approach. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 634-641.
- Becker, J., Eisenhauer, N., Scheu, S. & Jousset, A. (2012) Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters*, 15, 468-474.
- Blondon, F., Marie, D., Brown, D. & Kondorosi, A. (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37, 264-270.
- Bonfante, P. & Anca, I.A. (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63, 363-383.
- Borer, E.T., Seabloom, E.W. & Tilman, D. (2012) Plant diversity controls arthropod biomass and temporal stability. *Ecology Letters*, 15, 1457-1464.
- Brooks, P.D., Williams, M.W. & Schmidt, S.K. (1998) Inorganic nitrogen and microbial biomass dynamics before and during spring snowmelt. *Biogeochemistry*, 43, 1-15.
- Brussaard, L., De Ruiter, P.C., & Brown, G.G. (2007) Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 121, 233-244.
- Chapin III, F.S., Walker, B.H., Hobbs, R.J., Hooper, D.U., Lawton, J.H., Sala, O.E. & Tilman, D. (1997) Biotic Control over the Functioning of Ecosystems. *Science*, 277, 500-504.
- Curtis, T.P., Sloam, W.T. & Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 10494-10499.
- De Deyn, G.B., Raaijmakers, C.E. & van der Putten, W. (2004) Plant community development is affected by nutrients and soil biota. *Journal of Ecology*, 92, 824-834.
- Denison, R.F. & Kiers, E.T. (2004a) Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 187-193.

- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., van de Broek, A. & Vanderleyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212, 155-164.
- Douglas, A.E. (2008) Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist*, 177, 849-858.
- Duffy, J.E. (2003) Biodiversity loss, trophic skew and ecosystem functioning. *Ecology Letters*, 6, 680-687.
- Dyer, L.A. & Letourneau, D. (2003) Top-down and bottom-up diversity cascades in detrital vs. living food webs. *Ecology Letters*, 6, 60-68.
- Eisenhauer, N., Cesarz, S., Koller, R., Worm, K. & Reich, P.B. (2012) Global change belowground: impacts of elevated CO₂, nitrogen, and summer drought on soil food webs and biodiversity. *Global Change Biology*, 18, 435-447.
- Eparvier, A., Lemanceau, P. & Alabouvette, C. (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 177-184.
- Flynn, D.F.B., Gogol-Prokurat, M., Nogeire, T., Molinari, N., Richers, B.T., Lin, B.B., Simpson, N., et al. (2009) Loss of functional diversity under land use intensification across multiple taxa. *Ecology Letters*, 12, 22-33.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. & Tarkka, M. (2007) The mycorrhizal helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176, 22-36.
- Gamfeldt, L., Hillebrand, H. & Jonsson, P.R. (2008) Multiple functions increase the importance of biodiversity for overall ecosystem functioning. *Ecology*, 89, 1223-1231.
- Gera Hol, W.H., De Boer, W., Termorshuizen, A.J., Meyer, K.M., Schneider, J.H.M., van Dam, N.M., van Veen, J.A., et al. (2010) Reduction of rare soil microbes modifies plant-herbivore interactions. *Ecology Letters*, 13, 292-301.
- Haddad, N.M., Crutsinger, G.M., Gross, K., Haarstad, J. & Tilman, D. (2011) Plant diversity and the stability of foodwebs. *Ecology Letters*, 14, 42-46.
- van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., et al. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396.
- van der Heijden, M.G.A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T.R., Rutten, M., van Logtestijn, R. & Staehelin, C. (2006a) Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 178-187.

- van der Heijden, M.G.A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, K., Boller, T., et al. (2006b) The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172, 554-562.
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & van Straalen, N.M. (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296-310.
- Hill, M.O. (1973) Diversity and Evenness: A unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54, 427-432.
- Hobbie, J. & Hobbie, E. (2006) ¹⁵N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in Arctic tundra. *Ecology*, 87, 816-822.
- Hong, J.J., Park, Y.S., Bravo, A., Bhattarai, K.K., Daniels, D.A. & Harrison, M.J. (2012) Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*. *Planta*, 236, 851-865.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. & Bohannan, B.J.M. (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6, 613-622.
- IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. (2007) The physical science basis: Summary for Policymakers. Cambridge University Press, New York.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J.J. (2004) Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 6-15.
- Lambers, H., Mougél, C., Jaillard, B. & Hinsinger, P. (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*, 321, 83-115.
- Landa, B.B., Mavrodi, D.M., Thomashow, L.S. & Weller, D.M. (2003) Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 93, 982-994.
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L. & Read, D. (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1016-1045.
- Legendre, P. & Legendre, L. (1998) Numerical ecology. *Elsevier*, Amsterdam.

- Lepinay, C., Rigaud, T., Salon, C., Lemanceau, P. & Mougel, C. (2012) Interaction between *Medicago truncatula* and *Pseudomonas fluorescens*: Evaluation of costs and benefits across an elevated atmospheric CO₂. *Plos One*, 7, e45740.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
- Loreau, M. (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos*, 91, 3-17.
- Lynch, J.M. & Whipps, J.M. (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129, 1-10.
- Maron, P.A., Mougel, C. & Ranjard, L. (2011) Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 403-411.
- Metcalf, C.J.E. & Mitchell-Olds, T. (2009) Life history in a model system: opening the black box with *Arabidopsis thaliana*. *Ecology Letters*, 12, 593-600.
- Moreau, D., Salon, C. & Munier-Jolain, N. (2007) A model-based framework for the phenotypic characterization of the flowering of *Medicago truncatula*. *Plant, Cell and Environment*, 30, 213-224.
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D. & White, P.J. (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1729-1739.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C. & Lemanceau, P. (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist*, 170, 165-175.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G. & Renella, G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P. & Mougel, C. (2007) Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 913-921.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 207-220.
- Philippot, L., Hallin, S. & Schloter, M. (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy*, 96, 249-305.

- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougél, C., Lemanceau, P. & Berta, G. (2009) Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19, 81-90.
- Plassart, P., Terrat, S., Griffiths, R., Thomson, B., Dequiedt, S., Lelievre, M., Regnier, T., et al. (2012) Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *Plos One*, 7, e44279.
- Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. & Chaussod, R. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5, 1111-1120.
- Ryabov, A.B. & Blasius, B. (2011) A graphical theory of competition on spatial resource gradients. *Ecology Letters*, 14, 220-228.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M. & Faeth, S.H. (2004) Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9, 275-280.
- Scheublin, T.R., van Logtestijn, R.S.P. & van Der Heijden, M.G.A. (2007) Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *Journal of Ecology*, 95, 631-638.
- Schmera, D., Baur, B. & Erős, T. (2012) Does functional redundancy of communities provide insurance against human disturbances ? An analysis using regional-scale stream invertebrate data. *Hydrobiologia*, 693, 183-194.
- Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J. & Teste, F.P. (2012) Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews*, 26, 39-60.
- Stirling, G. & Wilsey, B. (2001) Empirical relationships between species richness, evenness, and proportional diversity. *The American Naturalist*, 158, 286-299.
- Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Nowak, V., Regnier, T., Bachar, D., et al. (2011) Molecular biomass and metataxonomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microbial Biotechnology*, 1-7.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. & Olivier, J.M. (1997) Ade-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistical Computing*, 7, 75-83.

- Trouvelot, A., Kough, J.L. & Gianinazzi-Pearson, V. (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae* (Ed. By Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S.), pp. 217-221. INRA Presse, Paris, France.
- Vainio, E.J. & Hantula, J. (2000) Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, 104, 927-936.
- Veresoglou, S.D., Mamolos, A.P., Thornton, B., Voulgari, O.K., Sen, R. & Veresoglou, D.S. (2011) Medium-term fertilization of grassland plant communities masks plant species-linked effects on soil microbial community structure. *Plant and Soil*, 344, 187-196.
- Vincent, J.M. (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *Blackwell Scientific Publications*, Oxford.
- Vitousek, P., Aber, J., Howarth, D.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, R., Schlesinger, W.H., et al. (1997b) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7, 737-750.
- Vogelsang, K.M., Reynolds, H.L. & Bever, J.D. (2006) Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist*, 172, 554-562.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Freitag, T., Guillaumaud, N., et al. (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8, 2162-2169.
- Whipps, J.M. (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1198-1227.
- Whitton, B.A. & Potts, M. (2012) Introduction to the Cyanobacteria. In: *Ecology of Cyanobacteria II*. Springer, Netherlands.
- Wilson, G.W. & Hartnett, D.C. (1998) Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany*, 85, 1732-1738.
- Worm, B., Lotze, H.K., Hillebrand, H. & Sommer, U. (2002) Consumer versus resource control of species diversity and ecosystem functioning. *Nature*, 417, 848-851.
- Young, N.D., Mudge, J. & Ellis, T.N. (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 199-204.

- Yuan, H., Ge, T., Chen, C., O'Donnell, A.G. & Wu, J. (2012) Significant role for microbial autotrophy in the sequestration of soil carbon. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2328-2336.
- Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R. & Shoemaker, R.C. (2005) Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology*, 137, 1189-1196.

SUPPLEMENTAL DATA

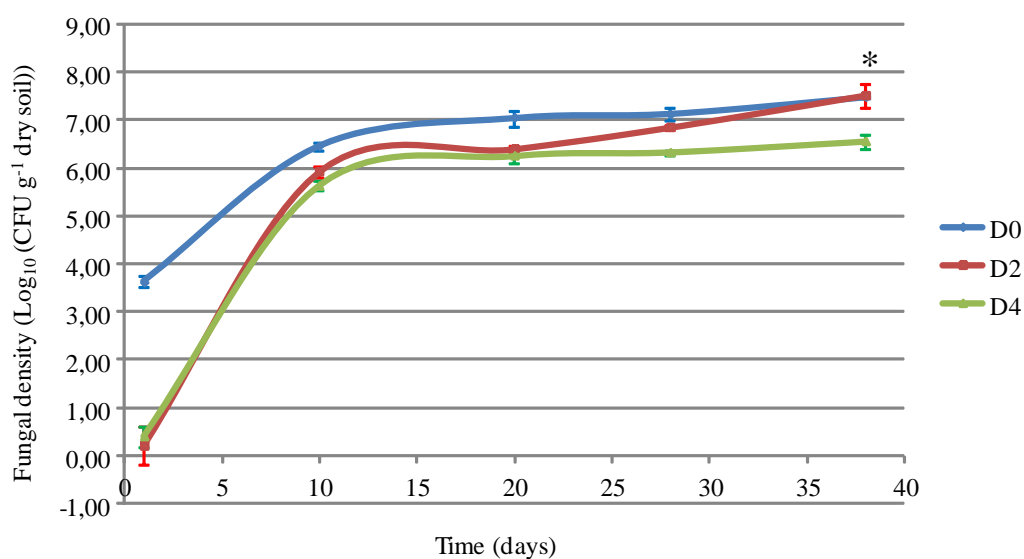


Figure 2.S1 Fungal density in soil during incubation period for the three diversity dilution (D0, D2, D4). Standard errors are represented by vertical bars. * After 38 days of incubation, the fungal densities of D0 and D2 were not significantly different but were significantly different of D4 ($F_{2,6} = 10.3$, $P = 0.01$).

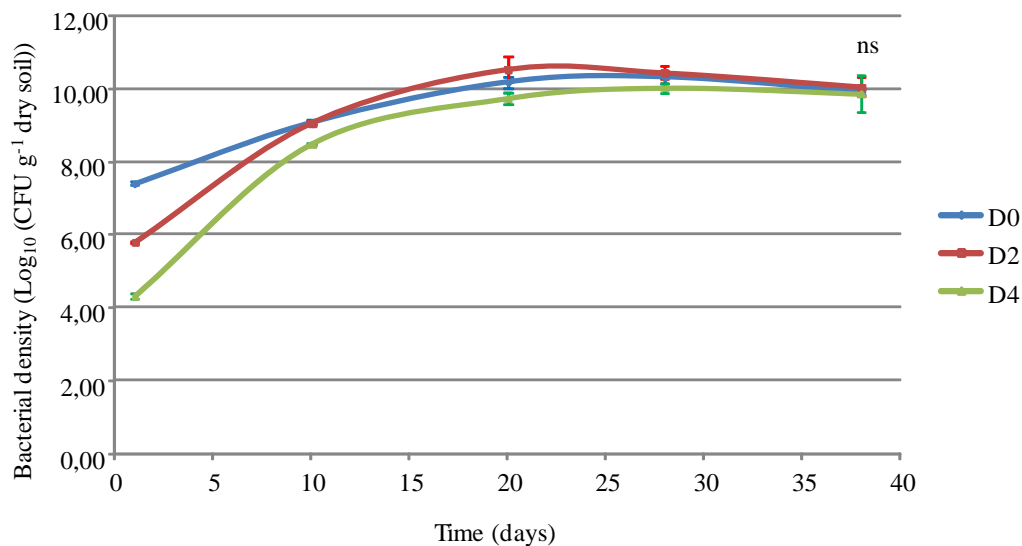


Figure 2.S2 Bacterial density in soil during incubation period for the three diversity dilution (D0, D2, D4). Standard errors are represented by vertical bars. ns: After 38 days of incubation, the bacterial densities of D0, D2 and D4 were not significantly different ($F_{2,6} = 0.09$, $P = 0.91$).

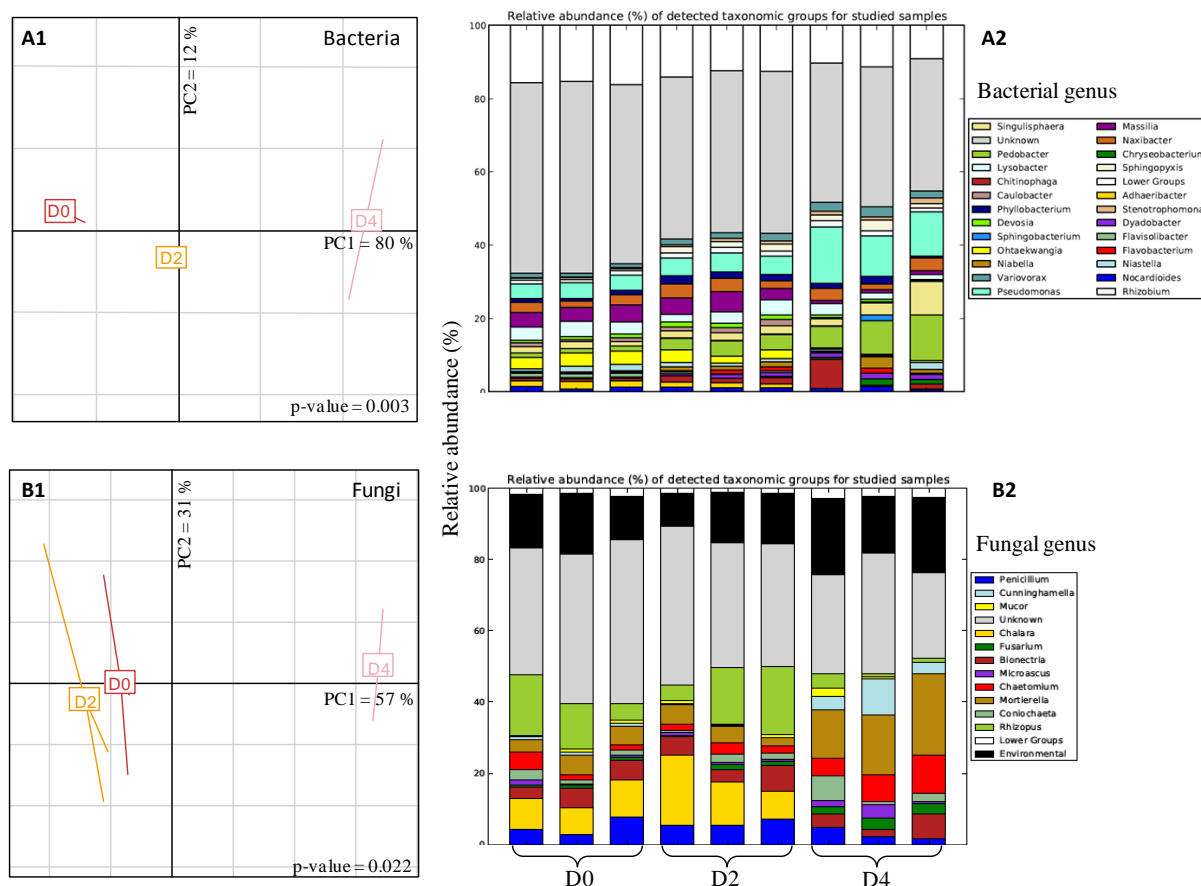


Figure 2.S3 Difference between the three dilutions after the incubation period of 44 days, based on taxonomic genus, visualised on a PCA, for (A1) bacterial and (B1) fungal community, and with barplots for (A2) bacteria and (B2) fungi. The p-values on PCA resulted for a Monte Carlo test performed (with 1000 permutations) to check if discrimination observed between the three dilutions based on the taxonomy at the genus level was significant. The p-values were below the threshold of significance of 5 % which meant a significant difference between the three dilutions. Principal component analysis and Monte Carlo tests were performed using the ADE-4 software (Thioulouse et al 1997). Concerning taxonomic barplots at the genus level, there are three barplots by dilution because three experimental replicates were carried out.

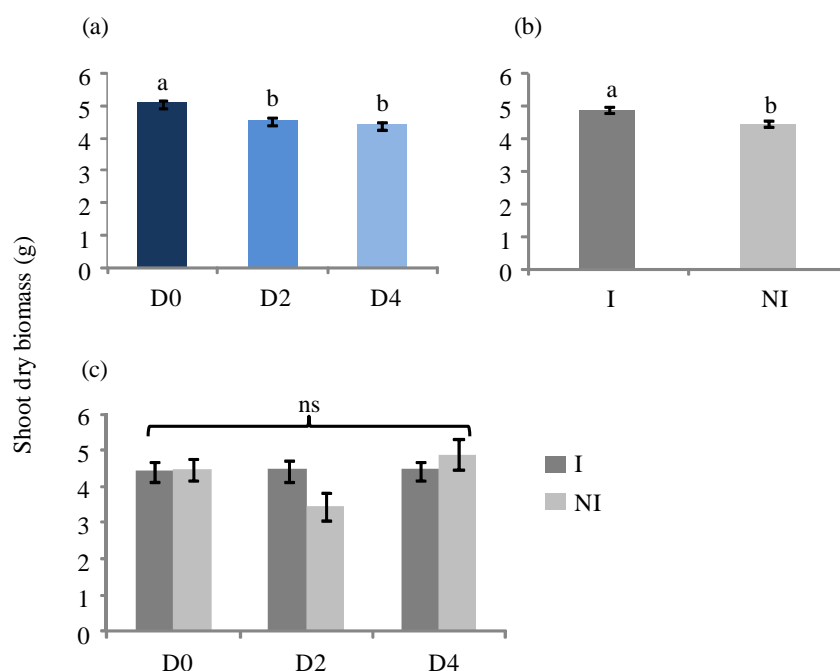


Figure 2.S4 Shoot dry biomass for *Medicago truncatula* depending on (a) the three diversity dilutions (D0, D2, D4, see text) and (b) the symbiont addition (I: inoculated with symbionts or NI: Not Inoculated with symbionts) and for *Brachypodium distachyon* in function of (c) symbiont addition (I or NI) and diversity level (D0, D2, D4). Standard errors are represented by vertical bars. Groups significantly different after a Tukey-Kramer's HSD test or Student t-test (for (b)) are indicated by different letters ($\alpha = 0.05$). ns means there was no significant difference between all the groups.

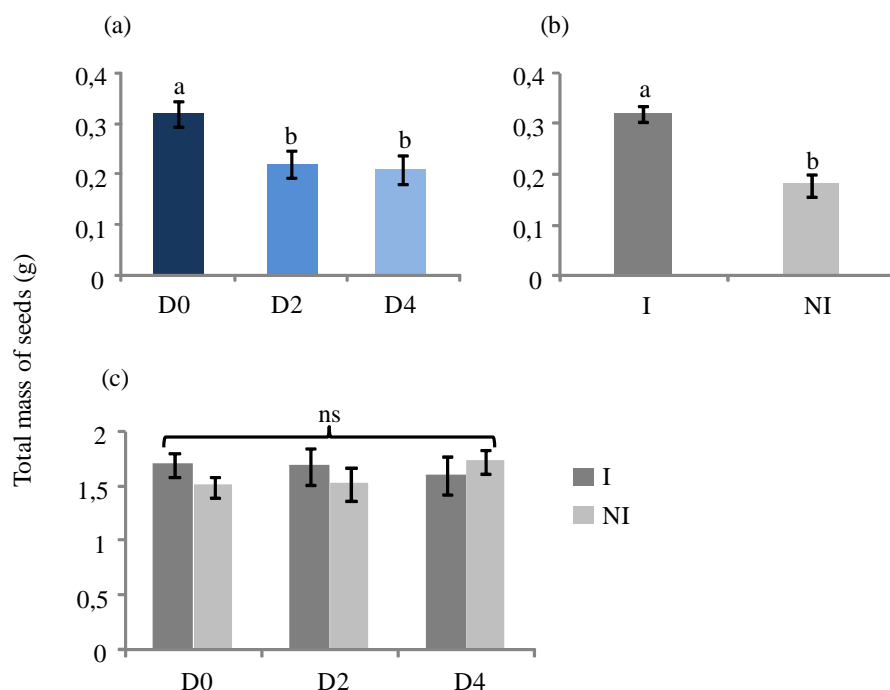


Figure 2.S5 Total mass of seeds for *Medicago truncatula* depending on (a) the three diversity dilutions (D0, D2, D4, see text) and (b) the symbiont addition (I: inoculated with symbionts or NI: Not Inoculated with symbionts) and for *Brachypodium distachyon* in function of (c) symbiont addition (I or NI) and diversity level (D0, D2, D4). Standard errors are represented by vertical bars. Groups significantly different after a Tukey-Kramer's HSD test or Student t-test (for (b)) are indicated by different letters ($\alpha = 0.05$). ns means there was no significant difference between all the groups.

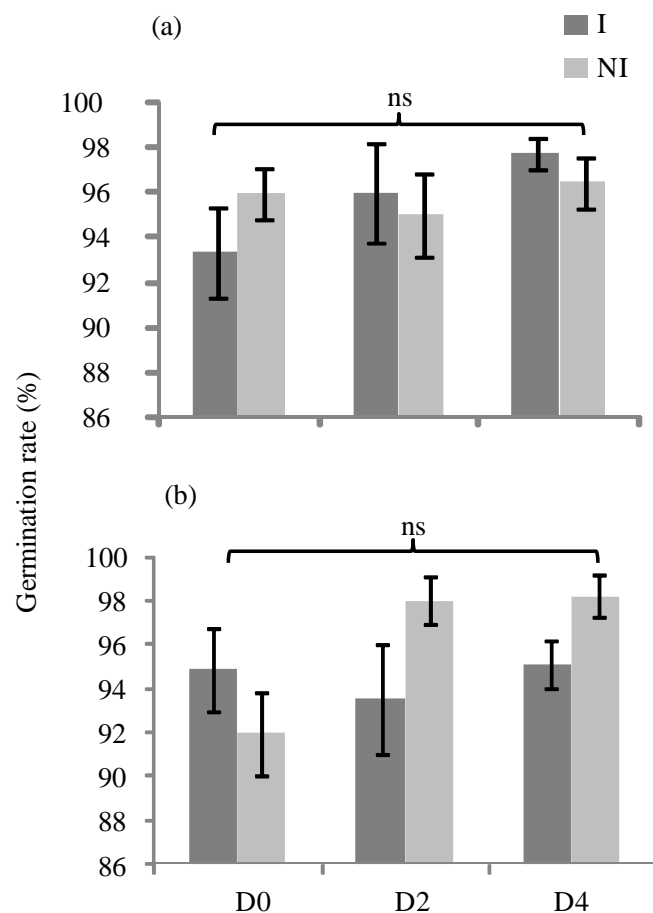


Figure 2.S6 Germination rate of seeds for (a) *Medicago truncatula* and (b) *Brachypodium distachyon* in function of symbiont addition (I: inoculated with symbionts or NI: Not Inoculated with symbionts) and diversity level (D0, D2, D4). Standard errors are represented by vertical bars. Groups significantly different after a Tukey-Kramer's HSD test are indicated by different letters ($\alpha = 0.05$). ns means there was no significant difference between all the groups.

Conclusion du Chapitre II

Ce second chapitre confirme le rôle fondamental des interactions symbiotiques dans le fonctionnement direct de la plante (croissance et reproduction) et démontre l'importance du reste de la communauté microbienne vis-à-vis des fonctions symbiotiques selon l'espèce végétale considérée (Figure 2.3). En diluant la diversité de la communauté microbienne, des pertes d'espèces, quelques gains ou plus fréquemment des remaniements d'espèces (mêmes espèces présentes dans les trois dilutions mais les abondances varient selon la dilution considérée) ont lieu. La diversité microbienne qui conditionne le fonctionnement optimal des espèces symbiotiques mutualistes pour la plante, s'avère d'autant plus importante chez les espèces végétales qui dépendent étroitement des microorganismes symbiotiques, telle que *M. truncatula*. Chez *M. truncatula*, qui dépend fortement des symbiotes, la dilution de diversité modifie de façon négative les interactions avec la plante et les interactions avec les symbiotes. A l'inverse, *B. distachyon*, qui dépend de façon moindre des symbiotes va bénéficier d'une diminution de la diversité de la communauté microbienne. En revanche, *A. thaliana*, qui ne nécessite aucun symbiote n'est pas affectée par une dilution du reste de la communauté.

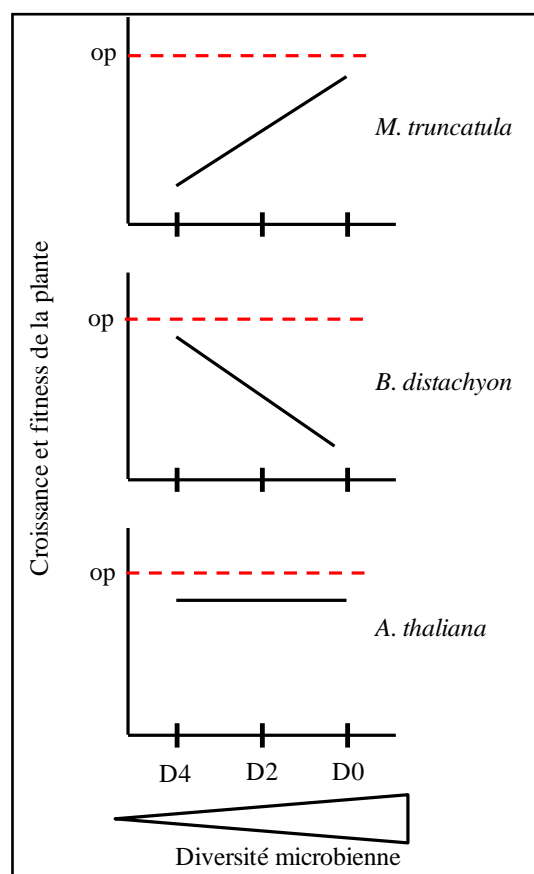


Figure 2.3 Bilan schématique des conséquences d’une dilution de diversité de la communauté microbienne sur la croissance et la fitness de trois espèces végétales (*Medicago truncatula*, *Brachypodium distachyon* et *Arabidopsis thaliana*). Ces schémas représentent la tendance générale à croître et se reproduire en comparaison à un optimum hypothétique de référence (op), symbolisé par la ligne rouge en pointillées, lorsque la diversité microbienne de la communauté rhizosphérique est décroissante ($D4 < D2 < D0$).

Il serait intéressant, pour une étude plus approfondie, d’utiliser différents types de sol, autrement dit, d’utiliser des diversités de communautés microbiennes d’origines géographiques différentes. En effet, le sol de Montpellier correspond à la région de diversification de *Medicago*, on peut donc penser que des phénomènes de co-évolution, entre les microorganismes de ce sol et *Medicago*, privilégient cette espèce végétale par rapport aux autres. Le fait de sélectionner davantage d’espèces végétales, dépendant plus ou moins de symbiotes, permettrait aussi de confirmer ou non les effets observés dans cette étude suite à une dilution de la diversité de la communauté microbienne. De plus, les stades végétatifs, au cours du développement de la plante (précocité de production de graines : espèces plus compétitive, nombre de feuilles : prédation, ...), sont des paramètres non négligeables d’un point de vue écologique pour une plante résidant dans un milieu naturel. Ainsi, afin de suivre

le développement des plantes, en interaction avec une communauté microbienne plus ou moins diversifiée, il aurait été intéressant de faire un suivi phénologique au cours du temps. Une telle analyse pourrait permettre notamment de suivre la composition de la communauté microbienne au cours du développement de la plante afin de comprendre au mieux les interactions plantes-microbes dans un tel contexte. Enfin, en vue de comprendre les effets des changements globaux sur l'interaction plantes-microbes, il aurait été intéressant de remplacer la dilution expérimentale de diversité par différentes intensités de travail du sol. De cette façon, le gradient de diversité de la communauté microbienne aurait été produit par les différents niveaux d'anthropisation.

CHAPITRE III

**Identification des communautés microbiennes actives au sein de la
rhizosphère de *Medicago truncatula*, en symbiose ou non**

CHAPITRE III

Identification des communautés microbiennes actives au sein de la rhizosphère de *Medicago truncatula*, en symbiose ou non

Préambule

Après avoir observé l'interaction plantes-microbes en intervenant au niveau de la plante avec une hausse du CO₂ atmosphérique (chapitre I) et au niveau des microorganismes avec la dilution de la diversité microbienne (chapitre II) ; ce troisième et dernier chapitre se focalise sur le compartiment rhizosphérique de la légumineuse *Medicago truncatula*. L'objectif est de distinguer la part active de la communauté microbienne, autrement dit les microorganismes utilisant les exsudats racinaires libérés par la plante. *M. truncatula* interagit avec deux microorganismes symbiotiques, une rhizobactérie et un champignon mycorrhizogène, dont on sait qu'ils utilisent les composés libérés par la plante (Offre et al 2007 ; Young et al 2003). L'intérêt se porte donc sur la part active du reste de la communauté microbienne. Pour cela, deux génotypes de *M. truncatula* ont été utilisés, le génotype sauvage J5 interagissant avec ses deux symbiotes et un génotype mutant TRV25 qui n'a pas la capacité d'établir d'interactions symbiotiques (Sagan et al 1995). Le carbone fourni à la plante au cours de sa croissance a été marqué avec un isotope stable, le ¹³C. Par conséquent, les composés carbonés libérés par la plante et utilisés par les microorganismes rhizosphériques seront enrichis en ¹³C, ce qui permettra de les identifier. Une distinction entre la partie racinaire et le sol rhizosphérique a été faite. L'identification des microorganismes a été réalisée grâce à la méthode DNA Sip (DNA-Stable isotope probing) (Radajewski et al 2000). Ce dernier chapitre devrait rendre possible l'identification des microorganismes utilisant les exsudats racinaires et le rôle des symbiotes dans la composition de cette part active de la communauté. Ce chapitre permettra de répondre aux questions suivantes :

- La part active de la communauté est-elle importante par rapport aux microorganismes n'utilisant pas les exsudats racinaires ?
- La part active de la communauté microbienne est-elle identique pour la racine et le sol rhizosphérique ?
- La part active de la communauté est-elle identique pour les deux génotypes de *M. truncatula* ?

Ce troisième chapitre, rédigé en français, servira de base à la rédaction d'une publication dans une revue scientifique du domaine de l'écologie microbienne.

Sommaire

RESUME.....	178
INTRODUCTION.....	179
MATERIELS ET METHODES	185
Condition de culture de <i>Medicago truncatula</i> et marquage isotopique.....	185
Prélèvement des plantes et extraction d'ADN.....	186
Isolement de l'ADN ¹³ C par ultra-centrifugation	186
Purification et dosage isotopique des fractions d'ADN légères et lourdes	188
Structure de la communauté microbienne rhizosphérique	188
Analyses statistiques.....	189
RESULTATS	190
Statut symbiotique et croissance des génotypes J5 et TRV25 de <i>M. truncatula</i>	190
Répartition des parts actives et inactives des communautés microbiennes dans la rhizosphère et abondances isotopiques	190
Structure génétique des communautés microbiennes actives, dans les compartiments racines et sol rhizosphérique, des génotypes J5 et TRV25 de <i>M. truncatula</i>	192
Effet du statut symbiotique sur la structure génétique des communautés microbiennes actives chez <i>M. truncatula</i>	194
DISCUSSION	197
Existence du lien trophique entre les communautés microbiennes et la plante et mise en évidence des parts actives et inactives.....	197
Localisation dans la rhizosphère de <i>M. truncatula</i> et effet sur la structure des communautés microbiennes actives et inactives	198
Structure de la communauté microbienne active et inactive au sein de la rhizosphère de <i>M.</i> <i>truncatula</i> en présence ou non des symbiotes	200
REMERCIEMENTS.....	203
BIBLIOGRAPHIE.....	204
DONNEES SUPPLEMENTAIRES	209

**Identification des communautés microbiennes actives au sein de la rhizosphère de
Medicago truncatula, en symbiose ou non**

Clémentine Lepinay¹, Tiffanie Regnier¹, Thierry Rigaud², Christophe Salon¹ and Christophe Mougél^{1*}

¹INRA, Agroécologie, UMR 1347, INRA/uB/AgroSup, 17 rue Sully, F-21065, Dijon, France

²CNRS, Biogeosciences, UMR 6282, CNRS/uB, 6 bd Gabriel, F-21000, Dijon, France

*Correspondance : E-mail: christophe.mougel@dijon.inra.fr, Tel : +33 3 80 69 30 53, Fax :
+33 3 80 69 32 24

RESUME

Les microorganismes du sol sont associés aux plantes par des liens trophiques qui reposent principalement sur l'élément carbone. En effet, les plantes produisent des composés carbonés utilisés par la communauté microbienne se situant dans une niche écologique particulière : la rhizosphère. La communauté microbienne rhizosphérique est constituée d'une multitude de microorganismes dont une partie seulement interagit réellement avec la plante, il s'agit de la part dite active. *Medicago truncatula* est une légumineuse capable de s'associer avec des microbes symbiotiques qui, pour certains, ne peuvent pas se passer de la plante pour leur survie et leur croissance. Les symbiotes sont étroitement liés au métabolisme végétal et développent des structures spécifiques en association avec la plante. L'objectif de cette étude était d'identifier la structure de la part active, des communautés bactériennes et fongiques, dans la rhizosphère de *M. truncatula*. De plus, l'effet des symbiotes sur cette structure a été étudié. Pour cela, deux génotypes de *M. truncatula* ont été utilisés. Le génotype sauvage J5 (phénotype Myc⁺ Nod⁺) et son mutant TRV25 (phénotype Myc⁻ Nod⁻) dépourvu d'association symbiotique ont été placés dans une atmosphère enrichie en isotope stable ¹³C. Cette méthode appelée, ADN SIP, a permis le marquage des composés carbonés produits lors de la photosynthèse et l'analyse des communautés microbiennes utilisant les exsudats racinaires marqués. Cette méthode de marquage du carbone a été couplée avec la technique d'analyse des espaces intergénomiques ribosomiques automatisée (ARISA) afin de caractériser la structure génétique des communautés bactériennes et fongiques au sein de deux compartiments rhizosphériques, la racine et le sol rhizosphérique. La présence des symbiotes influence la structure de la communauté microbienne dans la racine uniquement. De plus, la structure de la part active de cette communauté racinaire n'est pas significativement différente du compartiment sol rhizosphérique. Nos résultats mettent en avant le rôle des symbiotes vis-à-vis du reste de la communauté et donc les liens microbes-microbes qui résident au sein de la rhizosphère. Ces résultats devront être complétés par des analyses de composition de la communauté microbienne afin de comprendre concrètement la façon dont les symbiotes influencent la diversité de la communauté microbienne rhizosphérique.

MOTS CLES

ADN SIP, ARISA, rhizosphère, *Medicago truncatula*, symbiotes, communautés microbiennes, carbone, rhizodéposition

INTRODUCTION

Une plante ne peut pas être dissociée, en termes de fonctionnement, du compartiment sol dans lequel elle se trouve et en particulier des microorganismes qui y résident (van der Heijden et al 2008). En effet, ces derniers sont largement responsables de l'approvisionnement en nutriments de la plante, de façon directe (microorganismes symbiotiques) (Denison & Kiers 2004a ; van der Heijden et al 2008 ; Hobbie & Hobbie 2006) ou de façon indirecte en jouant sur la disponibilité de ces nutriments (microorganismes non symbiotiques) (Bardgett et al 2005). Les microorganismes du sol régulent ainsi l'abondance, la diversité et la productivité des communautés végétales (Bakker et al 2007 ; Eparvier et al 1991 ; van der Heijden et al 2008 ; Verbruggen et al 2012). Les plantes maintiennent ces interactions avec les microorganismes par la libération de molécules signal (Brencic & Winans 2005 ; Oldroyd et al 2011) et de composés carbonés dans le sol (Lambers et al 2009). Les plantes régulent, par ce biais, l'abondance, la diversité et l'activité des communautés microbiennes. De forts liens trophiques relient donc ces deux compartiments de l'écosystème et contribuent au fonctionnement de chacun (Nguyen 2003). Les plantes sont des organismes autotrophes qui font entrer le carbone dans l'écosystème en captant le CO₂ atmosphérique via le processus de photosynthèse qu'elles réalisent. Les produits de la photosynthèse, ou photosynthétats serviront principalement à la croissance végétale et le reste sera stocké au niveau des racines. Cependant, 17 % de ces photosynthétats seront libérés dans le sol par les racines sous forme de molécules carbonées plus ou moins complexes qui viennent s'ajouter aux autres substances libérées par la plante (cellules mortes, mucilage, ...) (Nguyen 2003). Ce phénomène, appelé rhizodéposition, va contribuer à la formation d'une zone de sol au niveau des racines qui va être sous l'influence du métabolisme de la plante, c'est l'effet rhizosphère. Ces molécules seront ensuite utilisées par les microorganismes du sol qui se trouvent à proximité des racines, au sein de la niche rhizosphérique. Comprendre le lien trophique qui associe ces deux compartiments passe donc par le suivi de cet élément carbone de la plante jusqu'aux microbes telluriques.

Afin de comprendre ces liens trophiques, il faut être capable de les quantifier et de caractériser les microorganismes impliqués dans ces processus. Parmi ces microorganismes, les symbiotes sont connus pour interagir avec la plante de façon étroite et utiliser les composés carbonés qu'elle fournit. Cependant, peu d'études se sont intéressées à la structure et la composition des communautés microbiennes métabolisant les composés carbonés libérés par la plante dans la rhizosphère. Ces microorganismes correspondent à la part des

communautés microbiennes hétérotrophe interagissant réellement avec la plante et considérée comme la fraction active.

Différentes méthodes ont été développées pour identifier les communautés microbiennes hétérotrophes actives. Ces méthodes sont basées sur une identification indirecte par le biais des produits de leur activité ou par la mise en évidence de processus biologiques régulés par ces microorganismes (décomposition, nitrification,...). Ces méthodes permettent de cibler uniquement quelques consortia microbiens car elles ciblent seulement certains processus biologiques.

Pour réaliser une identification plus large et plus précise de la part active d'une communauté microbienne hétérotrophe, une méthode consiste à suivre le devenir de l'élément carbone par son traçage isotopique. Dans cet objectif, la méthode ADN SIP (ADN Stable Isotope Probing) a été développée et décrite dans quelques études (Dunford & Neufeld 2010 ; Neufeld et al 2007a,b ; Radajewski et al 2000). Cette méthode permet de marquer l'ADN au moyen d'un isotope stable, dans notre cas il s'agit du ^{13}C . Les différents compartiments de l'écosystème (atmosphère, plantes, sol, ...) comportent naturellement une certaine quantité de cet isotope ^{13}C estimée en moyenne à 1,11 % du carbone total (Boutton 1991). Les plantes en C3 ont un delta ^{13}C moyen de -27 ‰ et les plantes en C4 de -13 ‰ (Boutton 1996).

Dans notre étude, du $^{13}\text{CO}_2$ a été utilisé pour marquer directement les composés organiques de la plante lors de la photosynthèse. Les molécules organiques marquées au ^{13}C se retrouveront dans les rhizodépôts et seront minéralisées par la biomasse microbienne active de la rhizosphère. Suite à l'activité des microorganismes hétérotrophes, une partie de ce ^{13}C sera intégrée dans la biomasse microbienne et une partie sera libérée sous forme de $^{13}\text{CO}_2$. (Figure 3.1). Il est possible de détecter ce carbone marqué dans la biomasse microbienne en extrayant l'ADN microbien de la rhizosphère et en distinguant par un gradient de densité la partie d'ADN ^{13}C de la partie d'ADN ^{12}C correspondant, respectivement, à la part active et la part non active. L'ADN enrichi en ^{13}C est plus lourd que l'ADN non marqué (^{12}C), ce qui permet de les séparer, selon leur différence de densité, au moyen d'une ultra-centrifugation sur un gradient de chlorure de césium (CsCl) (Neufeld et al 2007a). Cette méthode, associée à des outils d'écophysiologie et d'écologie moléculaire, permet de faire le lien entre le processus de rhizodéposition, la minéralisation de ces composés et l'identité taxonomique de la part active de la communauté microbienne (Cadisch et al 2005).

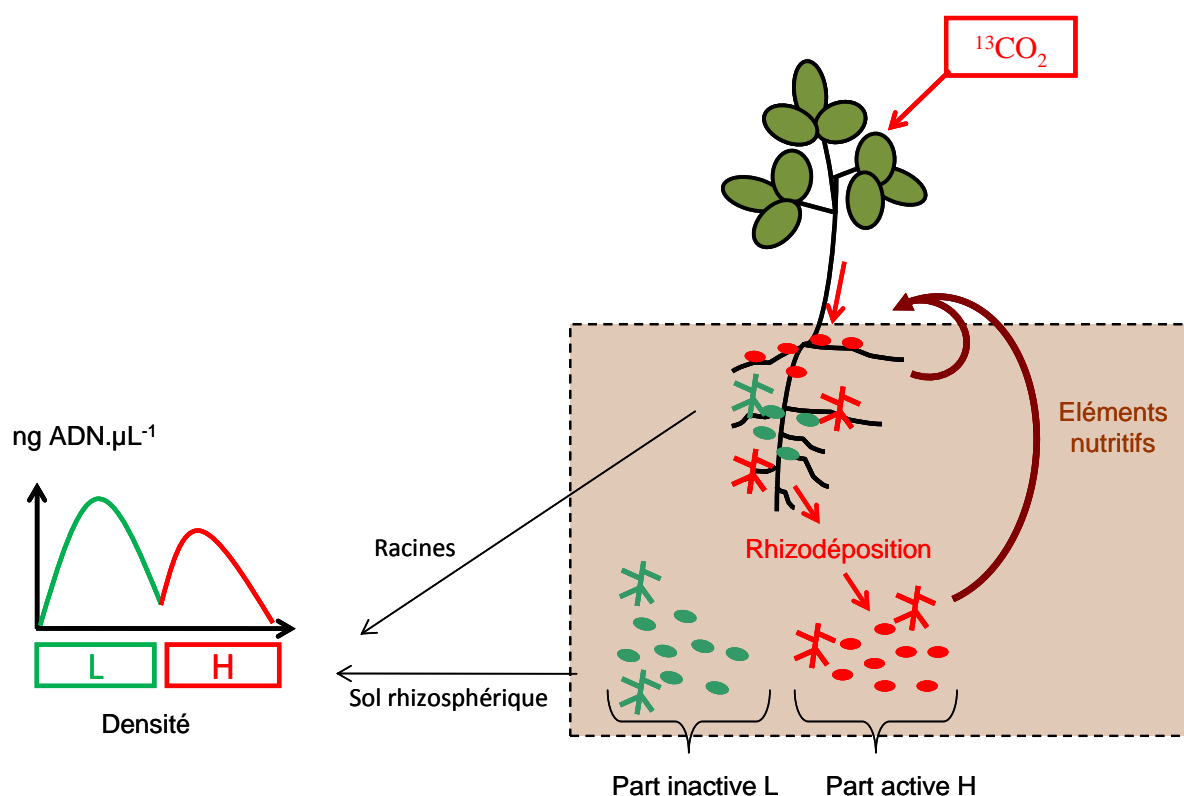


Figure 3.1 Représentation schématique du principe de l'analyse ADN SIP, réalisée dans cette étude, et contribuant au marquage isotopique des composés carbonés produits par la plante et libérés dans la rhizosphère puis potentiellement métabolisés par les microorganismes rhizosphériques. Une partie du ^{13}C sera intégrée dans l'ADN microbien néoformé et permettra d'identifier la part active des communautés microbiennes hétérotrophes, c'est-à-dire les microorganismes qui utilisent les composés fournis par la plante. Ces microorganismes interagissent avec la plante en lui fournissant, en retour, des éléments nutritifs (ou d'autres services contribuant à la croissance et la santé de la plante). L'extraction d'ADN, réalisée par la suite dans les compartiments racine et sol rhizosphérique, permet de distinguer deux pics où la concentration d'ADN est plus forte et qui représentent la part active (ADN de plus forte densité, enrichi en ^{13}C , H: heavy) et la part inactive (ADN de densité plus faible, peu ou pas enrichi en ^{13}C , L: light). C'est la différence de densité entre les deux types d'ADN qui permet de caractériser la part active des communautés microbiennes.

L'avantage de cette technique est qu'elle permet de s'affranchir des cultures microbiennes (Friedrich 2006) et de travailler dans des conditions se rapprochant de la réalité autrement dit au niveau de la rhizosphère (Cadisch et al 2005). Cela permet notamment

d'identifier le rôle des microorganismes, non cultivables en laboratoire, dans leur environnement naturel. Cette méthode peut ainsi être utilisée dans une multitude de milieux naturels (Friedrich 2006).

Cette technique ADN SIP a déjà fait ses preuves en permettant l'identification de microorganismes impliqués dans certains processus biologiques. Certaines études ont, par exemple, marqués des polluants afin de voir quels microorganismes étaient impliqués dans leur dégradation (Manefield et al 2004 ; Wackett 2004). Jia & Conrad (2009) ont également pu identifier les microorganismes autotrophes qui sont responsables de l'oxydation du surplus d'azote dans les sols agricoles. Du fait de leur autotrophie, le $^{13}\text{CO}_2$ qui leur a été fourni a permis de les identifier. D'autres travaux se sont focalisés sur la rhizosphère afin de mettre en évidence certains processus biologiques ayant lieu au sein de la niche rhizosphérique et d'identifier les microorganismes impliqués (Drigo et al 2012 ; Lee et al 2011). Haichar et al (2008) ont ainsi caractérisé la structure des communautés bactériennes au sein de la rhizosphère de quatre espèces végétales ; le blé (*Triticum aestivum*), le maïs (*Zea mays*), le colza (*Brassica napus*) et la luzerne (*Medicago truncatula*). De par les différences de structures observées, les auteurs ont montré indirectement l'importance de la composition des rhizodépôts, dont les différences sont liées à l'espèce végétale, dans la structure des communautés bactériennes.

Cependant, cette méthode comporte aussi certains inconvénients. La partie microbienne marquée au ^{13}C est constituée de microorganismes actifs et en dormance (Werth & Kuzyakov 2010). De plus, certains microorganismes sont marqués au ^{13}C bien qu'ils n'utilisent pas les composés libérés par la plante (Friedrich 2006). Cela peut s'expliquer par le fait qu'ils consomment des métabolites marqués libérés par certains microorganismes qui, eux, ont utilisé les composés marqués libérés par la plante. Cet inconvénient confère néanmoins l'avantage de pouvoir refléter les interactions microbes-microbes (Friedrich 2006). De plus, cette méthode ne reflète pas forcément la dynamique des communautés microbiennes car elle étudie à un instant donné l'ADN microbien. Cela pose un problème lié à la dilution isotopique du ^{13}C dans l'ADN microbien qui contribue à mimer l'intensité et le temps d'utilisation des rhizodépôts par les communautés microbiennes hétérotrophes (Friedrich 2006). En effet, la composition des communautés microbiennes varie avec le temps selon la variation temporelle dans la quantité et la composition des composés carbonés libérés par la plante au cours de sa croissance (Mougel et al 2006).

D'autres isotopes peuvent être introduits dans le sol, comme le ^{15}N ou le ^{18}O , afin de cibler d'autres composés (Friedrich 2006 ; Neufeld et al 2007a). Une technique similaire

consiste à introduire de l'azote marqué, le ^{15}N , dans le sol (Cadisch et al 2005 ; Hobbie & Hobbie 2006). Cette application de la méthode ADN SIP est moins sensible que l'enrichissement en ^{13}C , mais permet l'identification des populations microbiennes actives utilisant spécifiquement les substrats azotés (Cadisch et al 2005).

A la suite du marquage isotopique avec la méthode ADN SIP, lorsqu'on a isolé l'ADN d'intérêt, c'est-à-dire l'ADN qui constitue la part active de la communauté microbienne, des outils de biologie moléculaire peuvent être utilisés (ARISA, séquençage massif, ...) (Neufeld et al 2007a ; Schmeisser et al 2007). Ces analyses permettent de déterminer la structure et la composition de la communauté étudiée.

Cette étude s'intéresse plus particulièrement à la rhizosphère de *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong. *Medicago truncatula* est une légumineuse modèle en raison de ces associations symbiotiques avec des bactéries, les rhizobia, qui engendrent la formation de structures spécifiques, appelées nodosités, au niveau des racines de la plante. Cette association confère à la plante la capacité de capter l'azote atmosphérique par l'intermédiaire des nodosités (Young et al 2003). *Medicago truncatula* s'associe également avec des champignons endomycorhizogènes qui lui permettent une nutrition phosphatée optimale (Offre et al 2007).

Concernant le reste de la communauté microbienne rhizosphérique de *M. truncatula*, sa composition reste très peu étudiée. Offre et al (2007) ont identifié les principaux groupes bactériens associés à cette plante. L'étude de Mougel et al (2006) a mis en évidence des différences de structure de la communauté, en fonction du stade de développement de *M. truncatula* J5, attribuées à des variations dans la quantité et la qualité des rhizodépôts au cours de la croissance de la plante (Houlden et al 2008 ; Kuzyakov & Domanski 2000). L'intérêt d'une étude ADN SIP, dans ces conditions, est d'avoir une vision globale du système en identifiant les grands groupes microbiens qui interagissent avec la plante. Des études ont montré que la présence des microorganismes symbiotiques mutualistes influence la structure génétique et la diversité des communautés microbiennes et que celles-ci influencent l'établissement de la symbiose (Offre et al 2007 ; Pivato et al 2008, 2009).

Afin de mettre en évidence les interactions entre les symbiotes et le reste de la communauté microbienne, deux génotypes de *M. truncatula* ont été utilisés. Le génotype sauvage J5 (phénotype $\text{Myc}^+ \text{Nod}^+$) et le mutant TRV25 incapable d'établir des interactions symbiotiques de type mycorhizes et nodosités (phénotype $\text{Myc}^- \text{Nod}^-$) (Sagan et al 1995). Chez le mutant TRV25, les gènes impliqués dans l'infection de la plante par les symbiotes

sont défectueux (Sagan et al 1995), cependant le fonctionnement de la plante en terme de libération de composés carbonés par les racines n'est pas affecté.

L'objectif de cette étude est donc de se placer au niveau d'un système d'interaction complet de type plante / microorganismes symbiotiques / microorganismes non symbiotiques, et de mettre en évidence les liens trophiques qui unissent la plante et les microorganismes mais également les interactions entre les différents types de microorganismes.

Ce travail contribue à décrire le fonctionnement des interactions plante-microbes au sein de la rhizosphère de *M. truncatula* en répondant aux questions suivantes : (i) les microorganismes utilisant les composés carbonés délivrés par la plante sont-ils les mêmes dans la racine et dans le sol rhizosphérique? (ii) dans quelle mesure la présence des symbiotes influence la composition de la communauté microbienne ?

MATERIELS ET METHODES

Condition de culture de *Medicago truncatula* et marquage isotopique

Cinq plants de *M. truncatula* Gaertn. cv. Jemalong lignée J5 (Myc+ Nod+) et cinq plants de la lignée TRV25 (Myc- Nod-) ont été cultivés dans des chambres de cultures alimentées avec du CO₂ ayant subi un marquage isotopique au ¹³C.

Les graines ont été scarifiées et désinfectées par des bains successifs dans de l'acide sulfurique à 98 %, pendant 2 min, de l'éthanol à 96°, pendant 5 min et de l'hypochlorite de sodium à 3,5 %, pendant 10 minutes. Des rinçages à l'eau osmosée stérile sont effectués entre chaque bain. Les graines sont ensuite mises à pré-germer sur eau gélosée à 0,7 %, à 25 °C et à l'obscurité, durant 4 jours.

Le sol utilisé est un sol limono argileux provenant de Montpellier (Mas d'Imbert, Montpellier, France) contenant 39,40 % d'argile, 49,10 % de limon et 11,50 % de sable. Ces principales caractéristiques physicochimiques sont : pH 7,6, 23 g.kg⁻¹ matière organique totale, 12,18 ratio C/N, 2,6 mg.kg⁻¹ NO₃⁻, 0,42 mg.kg⁻¹ NH₄⁺ et 0,03 g.kg⁻¹ P₂O₅.

Les plantes sont arrosées tous les 3 jours, à l'eau déminéralisée, dans le but de maintenir l'humidité du sol à 29,3 %. La quantité d'eau à apporter est déterminée par pesées des pots et calcul du différentiel par rapport au poids de référence.

La croissance des plantes s'est déroulée dans des chambres de cultures étanches permettant de contrôler la composition des gaz atmosphériques fournis à la plante et de maintenir des conditions de croissances constantes (chambres de cultures développées et gérées par le Groupe de Recherche Appliquées en Phytotechnologie, CEA Cadarache, France). La photopériode était de 16/8 h (jour/nuit), la thermopériode de 25/21 °C (jour/nuit) et la luminosité à hauteur du pot de 500 μmol.m⁻².s⁻¹. L'humidité relative était de 75/85 % (jour/nuit). Les plantes ont ainsi été cultivées durant 71 jours.

Du ¹³CO₂ pur (>99 % atomes ¹³C ; CortecNet, Paris, France) a été injecté dans la chambre de culture, par injections automatiques, de manière à maintenir la concentration en CO₂ dans la chambre de culture à 380 μl.l⁻¹ durant les 71 jours de croissance des plantes. L'excès de ¹³CO₂ a été fixé à >80 % d'atomes ¹³C durant les 10 premiers jours puis >90 % d'atomes ¹³C par la suite. Les teneurs en ¹²CO₂ et ¹³CO₂ à l'intérieur des chambres de culture ont été continuellement suivies par spectroscopie proche infrarouge (IRGA Mahiak). La teneur en ¹³CO₂ a été maintenue aux valeurs fixées par piégeage du CO₂ total par de la chaux sodée et injection concomitante de ¹³CO₂ (99 % en carbone 13), de manière à minimiser la teneur en ¹²CO₂ issue de la respiration des sols.

Prélèvement des plantes et extraction d'ADN

Les plantes ont été récoltées après 71 jours de croissance. Les racines avec le sol adhérent (sol rhizosphérique) sont récupérées. Les racines ont été nettoyées par immersion dans 50 ml d'eau osmosée stérile puis mises sous agitation (vortex à 30 Hz durant 1 min). Elles sont ensuite pesées puis immergées dans de l'azote liquide et stockées à -80 °C. L'eau de lavage des racines contenant le sol adhérent a été centrifugée à 9000 g pendant 10 min afin de récupérer le sol. Le sol rhizosphérique est ensuite congelé à l'azote liquide puis stocké à -80 °C.

Les racines de *M. truncatula* ont été broyées dans de l'azote liquide. Le protocole décrit par Mougél et al (2006) a été utilisé afin d'extraire l'ADN des racines broyées et du sol rhizosphérique. Ce protocole repose sur une extraction chimique et mécanique de l'ADN à partir de 2 g de matière équivalent sec. Pour chaque échantillon (racine ou sol rhizosphérique) le ratio du tampon d'extraction est de 4 /1 (v/m). En résumé, 2 g de chaque échantillon (racine ou sol rhizosphérique) ont été mélangés à 8 mL d'une solution contenant 100 mM Tris (pH 8,0), 100 mM EDTA (pH 8,0), 100 mM NaCl et 2 % (m/v) de Dodécylsulfate de sodium. A ces produits sont ajoutés 4 g de billes de silice de 0,1 mm de diamètre, 5 g de billes de céramique de 1,4 mm de diamètre et 8 billes de verre de 4 mm de diamètre. Le mélange a été homogénéisé dans un agitateur FastPrep (FastPrep 24, MP biomedicals, France), à 4 m.s⁻¹, pendant 90 s. Les échantillons ont ensuite été incubés à 70 °C pendant 30 min puis centrifugés à 7000 g pendant 5 min à 20 °C. Le surnageant collecté a été incubé pendant 10 min dans la glace avec 1/10 du volume d'acétate de potassium 3 M (pH 5,5), puis centrifugé à 14000 g pendant 5 min à 4 °C. Après la précipitation dans 1 volume d'isopropanol à -20 °C, les acides nucléiques sont lavés dans de l'éthanol à 70 %. La concentration d'ADN dans les extraits bruts recueillis après extraction a été déterminée, selon la description de Ranjard et al (2003), en utilisant une courbe standard de thymus de veau. Cette concentration d'ADN des extraits a permis d'estimer la biomasse microbienne des racines et du sol rhizosphérique.

Isolement de l'ADN ¹³C par ultra-centrifugation

La centrifugation du gradient de densité s'effectue dans des tubes spécifiques de 6 ml (polyallomer UltraCrimp tubes, Sorvall, Langenselbold, Allemagne) et dans une ultracentrifugeuse TFT 70,38 (Kontron, Zurich, Suisse). L'ADN obtenu après extraction (150 µl par tube de centrifugation) a été mélangé avec une solution de chlorure de césium (CsCl) d'une densité de 1,7 g.ml⁻¹ (5,7 g CsCl dissout dans 3,4 ml d'une solution composée de 10

mM Tris et 1 mM EDTA, pH 8). Ce mélange a été mis à centrifuger pendant 72 h à 40 000 rpm et 20 °C.

Une fois centrifugé, le gradient de densité formé a été fractionné en prélevant délicatement, à l'aide d'une seringue, 24 fractions de 200 µl, du sommet du tube jusqu'au bas. Pour les 24 fractions de chaque échantillon d'ADN (racine ou sol rhizosphérique), obtenues suite au gradient de CsCl, la concentration d'ADN a été dosée avec le kit Picogreen (Molecular Probes, Paris, France). Pour cela, les fractions d'ADN ont été déposées dans des puits (2 µl par puit) disposés sur des plaques (Fast Optical 96w plates barcoded, Applied Biosystems, France) qui ont été analysées au StepOne (StepOnePlus Real-Time PCR System, Applied Biosystems, France). L'ADN à doser est mélangé à 48 µl de TE 1X et 50 µl de picogreen.

Les concentrations d'ADN ainsi obtenues, suite au dosage, ont permis de distinguer les fractions où la concentration d'ADN était plus importante. Pour les plantes marquées au ^{13}C , deux pics ont été mis en évidence ; ils correspondent à l'ADN léger (^{12}C) et à l'ADN lourd (^{13}C). L'ensemble des fractions, constituant les pics d'ADN léger et lourd, ont été regroupées afin de créer une seule fraction appelée respectivement, légère (L) ou lourde (H) (Figure 3.2).

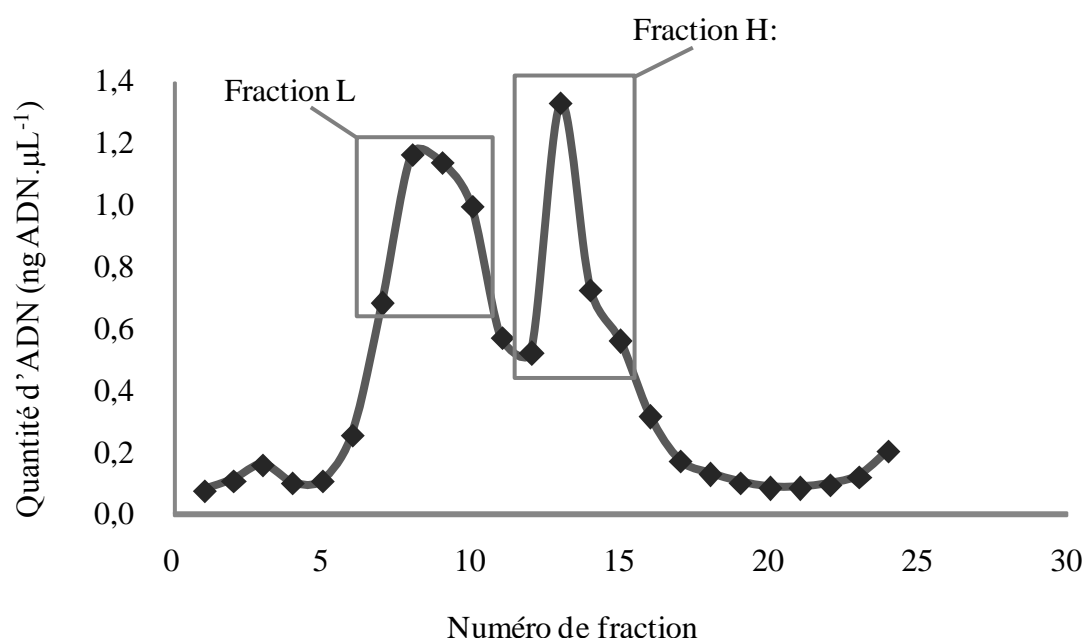


Figure 3.2 Exemple d'un gradient de centrifugation ayant permis de séparer les fractions d'ADN légères (L: ADN de faible densité, peu ou pas enrichi en ^{13}C) et lourdes (H: ADN de forte densité, enrichi en ^{13}C).

Purification et dosage isotopique des fractions d'ADN légères et lourdes

La purification, de l'ensemble des fractions d'ADN L et H obtenues, a été réalisée en utilisant le kit GeneClean (GeneClean Turbo kit, Q-Biogene, France) selon le protocole décrit par Bernard et al (2007).

Un dosage isotopique du ^{13}C dans les fractions légères et lourdes a été effectué. Les analyses isotopiques du ^{13}C ont été réalisées en utilisant un analyseur élémentaire (Vario, Elementar, Allemagne) couplé à un spectromètre de masse isotope ratio (Isoprime, Elementar, UK) en mode flux continu. La précision interne était de 0,15 ‰. L'appareil a été calibré avec un isotope standard d'USGS 40 (IAEA, Vienna) avec une valeur de $\delta^{13}\text{C}$ de -26.389 ‰ ($\pm 0,042$). Chaque échantillon a été mesuré 3 fois et le résultat est une moyenne de ces 3 réplicats. Pour éviter les "effets de taille", le poids des échantillons a été adapté pour contenir à peu près la même quantité de carbone. Pour cela, du TE (Tris 0,1 M + EDTA 0,01 M) a été ajouté en quantité nécessaire à chaque échantillon d'ADN. Les enrichissements en ^{13}C dans les échantillons d'ADN ($^{13}\text{C}_{\text{DNA}}$) sont calculés en utilisant l'équation suivante :

$$^{13}\text{C}_{\text{DNA}} (\%) = [^{13}\text{C}_{\text{mix}} \times (\text{C}_{\text{DNA}} + \text{C}_{\text{TE}}) - (^{13}\text{C}_{\text{TE}} \times \text{C}_{\text{TE}})] / \text{C}_{\text{DNA}}$$

Dans cette équation, $^{13}\text{C}_{\text{mix}}$ (%) est l'enrichissement isotopique de la fraction mélangée d'ADN et de tampon TE (Tris-EDTA), C_{DNA} (ng/μl) et C_{TE} (ng/μl) sont les teneurs en carbone de la fraction d'ADN extraite des échantillons de racine ou de sol rhizosphérique et la teneur en carbone du tampon TE, respectivement. Enfin, $^{13}\text{C}_{\text{TE}}$ (%) est l'enrichissement isotopique du tampon TE.

Structure de la communauté microbienne rhizosphérique

La structure génétique de la communauté bactérienne et fongique a été analysée grâce à la méthode ARISA (automated ribosomal intergenic spacer analysis), B et F respectivement. Cette méthode repose sur l'analyse du polymorphisme de longueur des espaces intergéniques (IGS) entre la petite sous-unité (16S pour les bactéries et 18S pour les champignons) et la grande sous-unité (23S pour les bactéries et 28S pour les champignons) des gènes codant pour l'ARN ribosomique. Les IGS bactériens et fongiques ont été amplifiés avec les amorces S-D-Bact-1522-b-S-20/L-D-Bact-132-a-A-18 et ITS1F/3126T, respectivement, et selon les conditions de PCR décrites par Ranjard et al (2003). Pour les PCR B et F-ARISA, 5 μl à 2,5 ng.μl⁻¹ et 10 μl à 2 ng.μl⁻¹ d'ADN, respectivement, ont été ajoutés, pour un volume PCR final de 25 μl. En vue des analyses de structures, bactériennes et fongiques, des amorces marquées

par fluorescence ont été utilisées dans les PCR B et F-ARISA. Le fluorochrome IRD 800 (MWG SA Biotech, Ebersberg, Allemagne) a ainsi été utilisé afin de le détecter dans le séquenceur ADN Licor (ScienceTec, Les Ulis, France). Au cours des PCR, les extrémités 5' des amorces S-D-Bact-1522-b-S-20 et 3126T sont marquées avec le fluorochrome.

Les produits PCR ont été purifiés avec le kit MinElute (QIAGEN, Courtaboeuf, France) et quantifiés en utilisant une courbe standard de thymus de veau. Une quantité de 2 µl de produit PCR purifié est ajoutée à 1 µl de formamide. Le mélange est placé à 90 °C pendant 2 min pour dénaturer l'ADN. Les fragments d'ADN sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide à 3,7 % et séparés grâce à une migration, sur le gel, en conditions dénaturantes pendant 16 h à 1500 V/80 W dans un séquenceur ADN Licor (ScienceTec, Les Ulis, France).

Les données sont analysées avec le logiciel 1D-Scan (ScienceTec) qui convertit les données de fluorescence en électrophorégrammes dans lesquels les pics représentent les fragments PCR. La hauteur des pics a été calculée avec l'option de filtre médian et l'intégration Gaussienne dans le logiciel 1D-Scan. Cette hauteur représente la proportion relative des fragments dans les produits de PCR totaux. Les longueurs (en paire de base) ont été calculées en utilisant un standard de taille avec des bandes allant de 200 à 1659 pb. Ce standard a été fait par amplification par PCR de fragments de tailles différentes du phage M13mp18 (Promega, Charbonnières, France).

Analyses statistiques

Les pourcentages de ^{13}C ainsi que les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ ont été comparés par des modèles linéaires prenant en compte le génotype, le compartiment considéré et la fraction d'ADN (légère : L ou lourde : H). Les groupes significativement différents ont été détectés avec des tests HSD de Tukey-Kramer et indiqués par différentes lettres. Ces analyses ont été réalisées avec le logiciel statistique JMP 5.0.1. avec un seuil de 0,05. Les données ARISA de structure des communautés bactériennes et fongiques obtenues avec le logiciel 1D-scan ont été analysées comme décrit dans Ranjard et al (2003). Les structures génétiques de ces communautés ont été comparées par des analyses en composantes principales (ACP). Des tests de Monte Carlo (avec 1000 répétitions) ont permis de vérifier si la différence observée entre les structures génétiques était significative. Les ellipses, regroupant chaque ensemble de réplicats, correspondent à un intervalle de confiance de 90 %. Les ACP ainsi que les tests de Monte Carlo ont été réalisés avec le package ade-4 (Thioulouse et al 1997) sous le logiciel R 2.9.2. Les valeurs présentées dans le texte correspondent aux moyennes \pm erreurs types.

RESULTATS

Statut symbiotique et croissance des géotypes J5 et TRV25 de *M. truncatula*

Le statut symbiotique du géotype J5 a été vérifié par une observation des nodosités formées par la rhizobactérie symbiotique au niveau des racines. En raison des contraintes techniques liées à la production de matériel végétal, la présence du symbiote mycorhizien, chez J5, n'a pas été vérifiée car elle impose la destruction du système racinaire. Cependant, des travaux précédents, réalisés avec le même sol, avaient confirmé que le géotype J5 est bien nodulé et mycorhizé dans ce sol et que le géotype TRV25 ne développe pas de symbioses avec ces deux partenaires (Offre et al 2007 ; Zancarini et al 2012). Nous avons donc émis l'hypothèse que les deux géotypes utilisés correspondaient aux deux phénotypes prévus.

Les biomasses végétales ont révélé une faible croissance végétale pour le géotype mutant TRV25, dépourvu de symbiotes, en comparaison au géotype J5, en interaction symbiotique avec les bactéries du genre *Sinorhizobium* et les champignons du genre *Glomus*. Les biomasses aériennes et racinaires, pour J5 et TRV25, sont respectivement de 5,1 g ($\pm 0,141$), 11,2 g ($\pm 0,554$), 0,1 g ($\pm 0,005$) et 0,4 g ($\pm 0,060$).

Répartition des parts actives et inactives des communautés microbiennes dans la rhizosphère et abondances isotopiques

L'enrichissement en ^{13}C , destiné à cibler la part active de la communauté microbienne rhizosphérique dans les compartiments racine et sol rhizosphérique a été mis en évidence et quantifié par un dosage isotopique. Le ratio isotopique du carbone ($\delta^{13}\text{C}$) a ainsi été mesuré pour chaque fraction. Le tampon TE, ayant servi de témoin négatif non enrichi en ^{13}C , a un $\delta^{13}\text{C}$ de -34,7 ‰ ($\pm 0,04$). Pour J5, les fractions d'ADN légères et lourdes des compartiments sol rhizosphérique et racine ont un $\delta^{13}\text{C}$ de -33 ‰ ($\pm 0,3$), -31 ‰ ($\pm 0,6$) et +84 ‰ ($\pm 11,4$), +75 ‰ ($\pm 13,8$), respectivement. Pour TRV25, les fractions d'ADN légères et lourdes des compartiments sol rhizosphérique et racine ont un $\delta^{13}\text{C}$ de -34 ‰ ($\pm 0,2$), -34 ‰ ($\pm 0,2$) et -11 ‰ ($\pm 6,8$), -18 ‰ ($\pm 4,2$), respectivement. Le modèle linéaire, réalisé sur les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$, permet de mettre en évidence un effet du géotype ($F_{1,30} = 30,9$; $p < 0,0001$) et un effet d'interaction entre le compartiment rhizosphérique et le géotype ($F_{1,30} = 36,6$; $p < 0,0001$). Ainsi, l'enrichissement en ^{13}C est toujours plus élevé dans le compartiment racinaire par rapport au sol rhizosphérique. De plus, dans le sol rhizosphérique, pour le géotype J5, il y a davantage de ^{13}C dans la fraction H par rapport à L et pour le géotype TRV25 il y a autant de ^{13}C dans les deux fractions, soit une quantité très faible et se rapprochant du témoin négatif.

En revanche, dans le compartiment racinaire, la valeur de $\delta^{13}\text{C}$ est plus importante dans la fraction L que dans la fraction H et cela quel que soit le génotype.

Le fait de mettre les teneurs en ^{13}C en pourcentage pondère ces teneurs par rapport à la teneur en carbone totale. Ces pourcentages de ^{13}C confirment la distinction évidente entre les deux compartiments de la rhizosphère étudiés, entre les fractions légères et lourdes et entre les deux génotypes (Figure 3.3). La teneur en ^{13}C est plus importante dans la racine que dans le sol rhizosphérique. La fraction L contient toujours une certaine quantité de ^{13}C , cependant, au sein de chaque génotype, la fraction H contient davantage de ^{13}C que la fraction L. Enfin, le génotype J5, quelle que soit la fraction ou le compartiment rhizosphérique, a une teneur moyenne en ^{13}C supérieure au génotype mutant dépourvu d'associations symbiotiques, TRV25 (Figure 3.3).

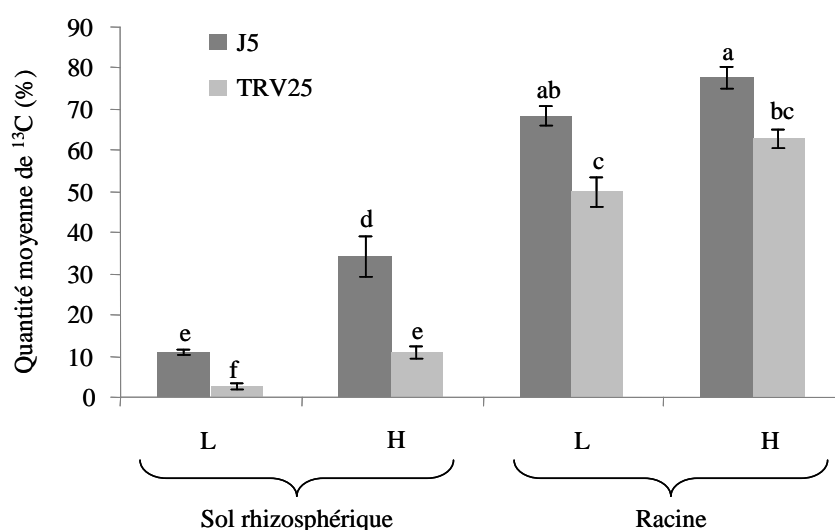


Figure 3.3 Quantité moyenne de ^{13}C (%) contenu dans les fractions légères (L) et lourdes (H) extraites des compartiments racine et sol rhizosphérique de *Medicago truncatula* en condition enrichie en ^{13}C pour les génotypes J5 et TRV25. Les erreurs-types sont représentées par des barres verticales. Les groupes significativement différents après un test HSD de Tukey-Kramer sont indiqués par différentes lettres ($\alpha = 0.05$).

Structure génétique des communautés microbiennes actives, dans les compartiments racines et sol rhizosphérique, des géotypes J5 et TRV25 de *M. truncatula*

La structure génétique des communautés bactériennes et fongiques a été déterminée par la technique ARISA. Les analyses statistiques en composantes principales ont été réalisées en distinguant pour chaque communauté (bactéries ou champignons), le géotype (J5 ou TRV25), le compartiment (Racine : R ou Sol Rhizosphérique : S) et la fraction considérée (Légère : L ou Lourde : H) (Figure 3.4). Des tests de Monte-Carlo ont permis de démontrer des différences significatives dans la structure génétique des communautés bactériennes et fongiques.

Pour J5, quelle que soit la communauté considérée (bactéries ou champignons), la fraction L du sol rhizosphérique se distingue toujours des fractions L et H du compartiment racinaire. Cette distinction se fait sur l'axe 1 qui explique 42 et 46 % de la variabilité observée pour les communautés bactériennes et fongiques, respectivement (Figure 3.4A, B).

Chez TRV25, un résultat similaire est observé, principalement pour la communauté bactérienne, avec une distinction, de la fraction L du sol rhizosphérique, sur l'axe 1 qui explique 60 % de variabilité (Figure 3.4C). Concernant la communauté fongique, cette distinction est plus légère mais tout de même significative et se fait par rapport à l'axe 2 qui explique 18 % de variabilité (Figure 3.4D).

En revanche, la fraction H du sol rhizosphérique a une structure génétique qui n'est pas significativement différente des fractions L et H de la racine, pour les communautés bactériennes et fongiques du géotype J5 (Figure 3.4A et B respectivement) et pour la communauté fongique du géotype TRV25 (Figure 3.4D). La seule différence concerne le géotype TRV25. En effet, pour la structure de la communauté bactérienne du géotype TRV25 (Figure 3.4C), la fraction H du sol rhizosphérique est différente de la fraction H de la racine (vérifié par un test de Monte Carlo, P-value = 0,020).

Il est intéressant de noter que la fraction H du sol rhizosphérique a une structure génétique intermédiaire entre la fraction L du sol rhizosphérique et les fractions L et H du compartiment racinaire (Figure 3.4A à D).

Enfin, la structure génétique des communautés bactériennes des fractions L et H, du sol rhizosphérique, est significativement différente quel que soit le géotype (confirmé par des tests de Monte Carlo, J5 : P-value = 0,005 et TRV25 : P-value = 0,001) (Figure 3.4A, C). A l'inverse, la structure des communautés fongiques, dans le sol rhizosphérique, pour les fractions L et H ne change pas significativement, quel que soit le géotype (Figure 3.4B, D).

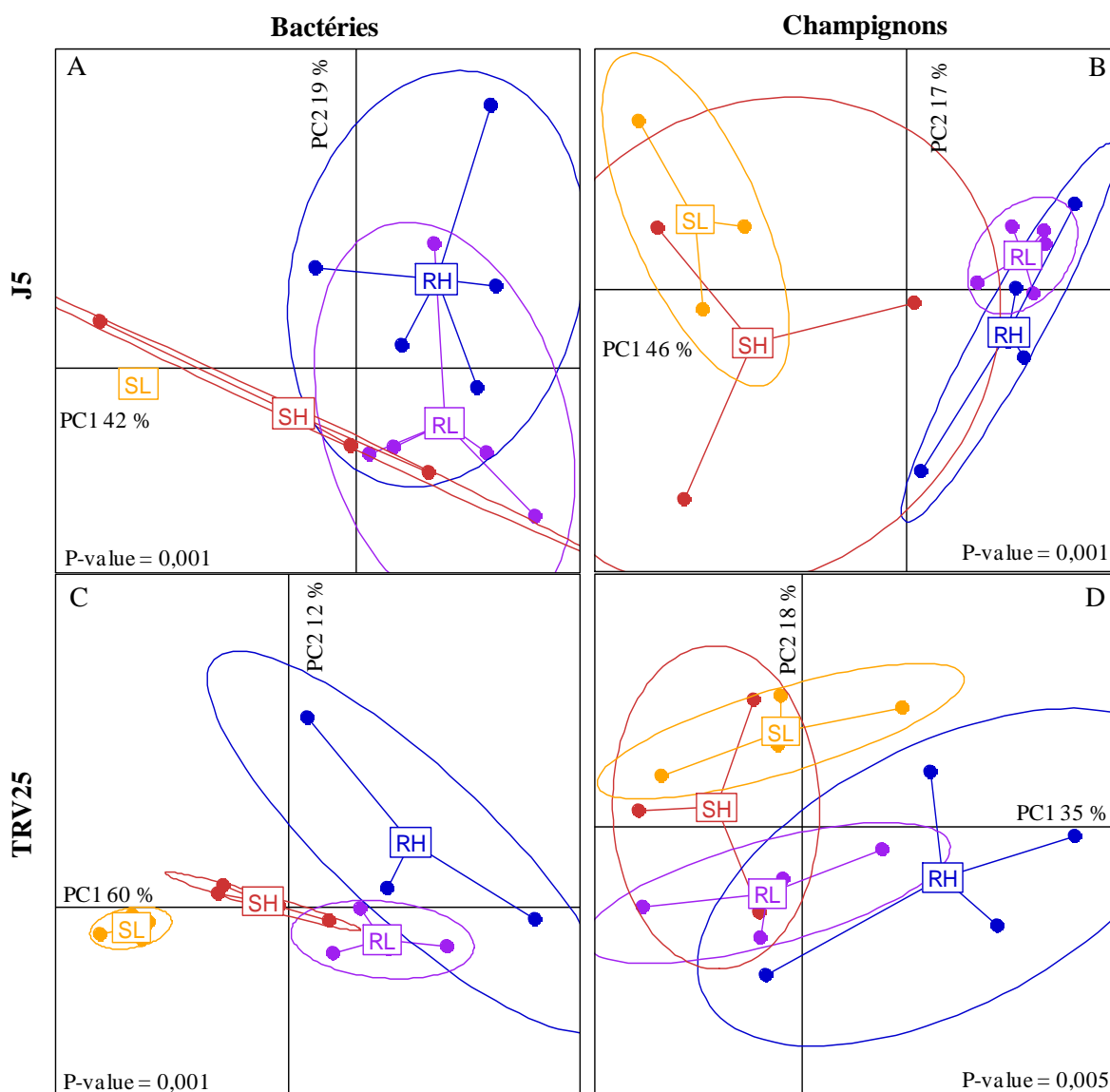


Figure 3.4 Analyse en composantes principales de la structure génétique bactérienne (A,C) et fongique (B,D) pour les fractions d'ADN légères (L) et lourdes (H) des compartiments racine (R) et sol rhizosphérique (S) pour les deux génotypes de *Medicago truncatula*, J5 (A,B) et TRV25 (C,D), en condition enrichie en ^{13}C . Les ellipses entourant chaque ensemble de réplicats correspondent à un intervalle de confiance de 90 %. Les P-value correspondent aux tests de Monte-Carlo au seuil de significativité de 5 %.

Effet du statut symbiotique sur la structure génétique des communautés microbiennes actives chez *M. truncatula*

Dans le compartiment racine, la structure de la communauté bactérienne, chez le mutant TRV25 dépourvu de symbiotes, n'est pas significativement différente entre les fractions L et H (Figure 3.5A). Pour le géotype J5, c'est uniquement la structure génétique de la fraction H des communautés bactériennes, de la racine, qui se distingue des fractions L et H de TRV25. Cette distinction se fait sur l'axe 1 qui explique 34 % de la variabilité. La fraction L chez J5 présente une structure génétique intermédiaire entre la fraction H de J5 et les fractions L et H de TRV25 (Figure 3.5A).

Concernant les champignons, la structure génétique des communautés fongiques se différencie significativement en fonction du géotype de plante sur l'axe 1 qui explique 44 % de variabilité (Figure 3.5B). Cependant, il n'y a pas de discrimination entre les fractions L et H, quel que soit le géotype considéré (Figure 3.5B).

Dans le compartiment sol rhizosphérique, la structure des communautés bactériennes varie entre les fractions L et H du géotype TRV25, de même que pour les fractions L et H de J5. Cette discrimination se fait sur l'axe 1 qui explique 44 % de variabilité (Figure 3.5C). De plus, la structure de la communauté bactérienne n'est pas affectée par le géotype mais par le fait qu'il s'agisse de la communauté active H ou non active L.

Enfin, concernant les champignons, aucune différence significative ($P\text{-value} = 0,147$) n'a été observée pour la structure génétique des communautés fongiques quel que soit le géotype ou la fraction considérée (Figure 3.5D).

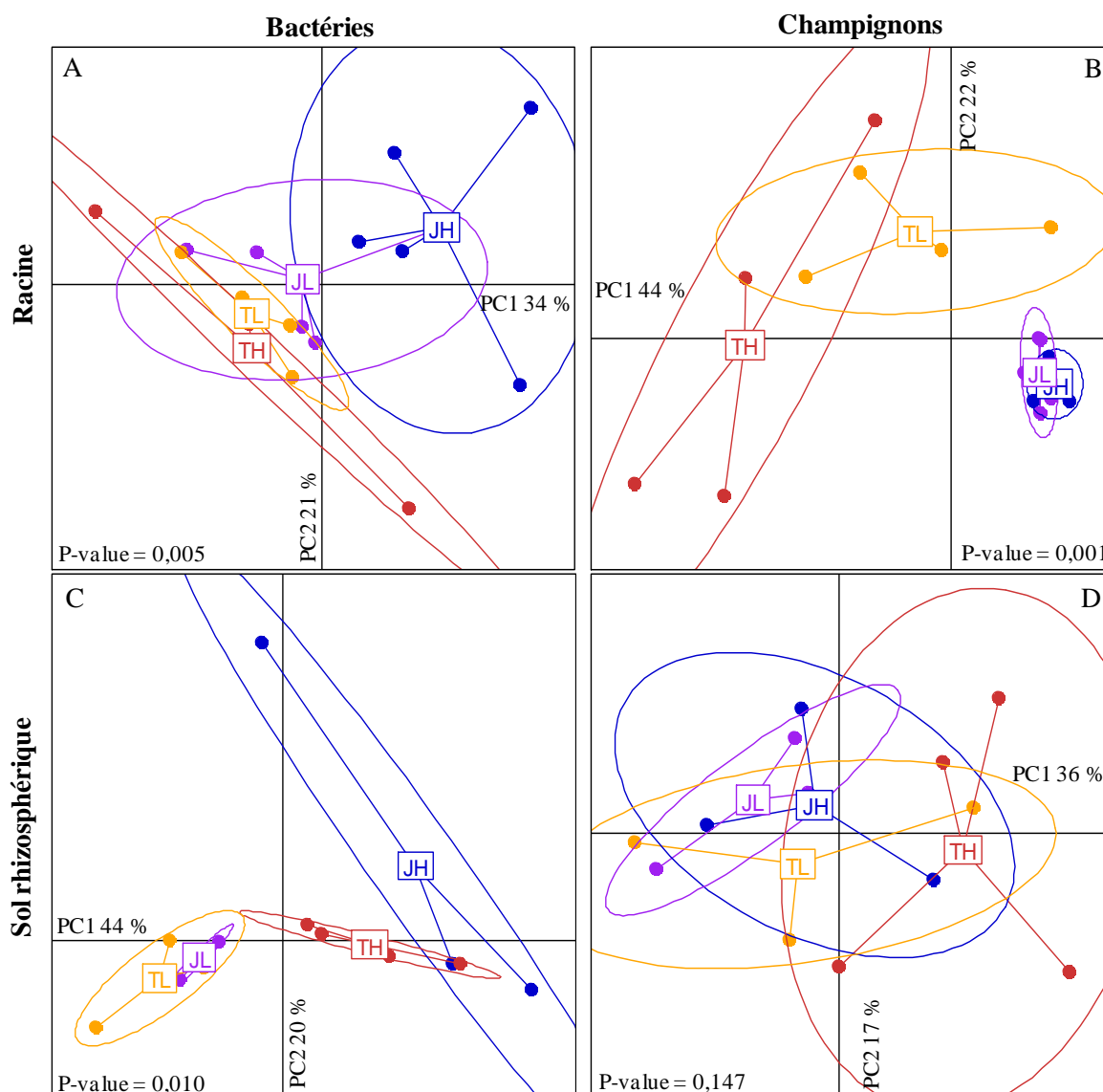


Figure 3.5 Analyse en composantes principales de la structure génétique bactérienne (A,C) et fongique (B,D) pour les fractions d'ADN légères (L) et lourdes (H) pour les deux géotypes de *Medicago truncatula*, J5 (J) et TRV25 (T) des compartiments racine (A,B) et sol rhizosphérique (C,D), en condition enrichie en ^{13}C . Les ellipses entourant chaque ensemble de réplicats correspondent à un intervalle de confiance de 90 %. Les P-value correspondent aux tests de Monte-Carlo au seuil de significativité de 5 %.

Le fait de cibler uniquement la part active (H) de la communauté microbienne, autrement dit les microorganismes qui utilisent les composés carbonés fournis par la plante, permet de confirmer l'effet génotype de *M. truncatula* sur la structure des communautés bactériennes et fongiques dans la racine (Données supplémentaires, Figure 3.S1). Cet effet est davantage marqué chez les champignons puisque la structure fongique entre les deux génotypes se différencie sur l'axe 1 qui explique 53 % de variabilité alors que pour les bactéries l'axe 1 qui différencie les deux structures bactériennes explique seulement 34 % de variabilité. Dans le compartiment sol rhizosphérique, il n'y a pas de différence significative concernant la structure de la communauté bactérienne active des deux génotypes. Il en est de même pour la structure de la communauté fongique. Cette absence de différence est particulièrement marquée, pour les bactéries, sur l'axe 1 qui explique 65 % de variabilité, ce qui montre que les structures sont très similaires (Données supplémentaires, Figure 3.S1).

DISCUSSION

Existence du lien trophique entre les communautés microbiennes et la plante et mise en évidence des parts actives et inactives

Les dosages isotopiques réalisés confirment l'enrichissement en ^{13}C des compartiments rhizosphériques et donc l'existence du lien trophique entre la plante et la communauté microbienne du sol.

Cependant, ce lien semble plus important pour le génotype sauvage J5 que pour son mutant TRV25 dépourvu de symbiotes racinaires. En effet, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ sont plus importantes chez J5, quel que soit le compartiment ou la fraction. Concernant le compartiment racinaire, ceci peut s'expliquer, en majeure partie, par la plus forte croissance de J5 dans ce sol comparé à TRV25 comme l'ont déjà montré Offre et al (2007). Or, comme la biomasse de la racine marquée au ^{13}C est prise en compte dans la part d'ADN marqué alors cela explique qu'elle soit plus importante chez J5. En revanche, dans le compartiment sol rhizosphérique, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ confirment l'importance du lien trophique chez J5.

La différence majeure entre ces deux génotypes est une mutation sur un gène qui entraîne l'établissement des symbiotes (Catoira et al 2000 ; Sagan et al 1995 ; Sanchez et al 2005). Cette mutation ne semble donc pas affecter la composition des rhizodépôts libérés par TRV25 (communication personnelle). On peut cependant supposer qu'en l'absence d'interactions symbiotiques l'importance du flux de composés carbonés libérés par la plante soit réduit, la plante limitant alors ces pertes en carbone (Nguyen 2003). Ainsi, la plus forte quantité de composés carbonés potentiellement libérés dans le sol chez J5, en comparaison à TRV25, attirerait davantage de microorganismes utilisant ces composés.

Il conviendrait cependant de coupler ces études d'écologie microbienne des communautés actives à des études écophysologiques permettant de quantifier et caractériser les flux de carbone de la plante. La mise en relation de ces données permettrait de mieux comprendre les interactions génotype de plante - communautés microbiennes dans la rhizosphère (Zancarini et al 2012, 2013).

La mise en évidence du lien trophique, par cette technique ADN SIP, permet de distinguer les parts actives et inactives des communautés microbiennes rhizosphériques.

En effet, la quantité plus forte de ^{13}C dans la fraction lourde de chaque compartiment confirme l'existence de la part active révélée par le marquage isotopique. Ce résultat valide la

stratégie ADN SIP appliquée à l'étude de l'écologie des communautés microbiennes dans la rhizosphère (Haichar et al 2008).

Le fait qu'il y ait du ^{13}C dans la fraction légère des compartiments racine et sol rhizosphérique peut être expliqué par différentes hypothèses. Dans la fraction L de la racine, l'ADN marqué de la plante étant majoritaire, il peut rendre difficile la distinction entre les ADN marqués ou non des communautés microbiennes. De plus, l'ADN de certains microbes, qui ont utilisé les composés marqués plus tôt au cours de la croissance de la plante, même s'ils ne les utilisent plus, conserve un traçage isotopique faible. Leur ADN, faiblement marqué se retrouvera donc dans la fraction L.

Localisation dans la rhizosphère de *M. truncatula* et effet sur la structure des communautés microbiennes actives et inactives

Un des paramètres les plus importants pour expliquer la structure des communautés microbiennes est l'effet spatial défini par la localisation des microorganismes dans la rhizosphère.

Il y a davantage de ^{13}C dans la racine par rapport au sol rhizosphérique, quelle que soit la fraction. Ce résultat est cohérent avec l'origine de l'ADN qui correspond quantitativement à de l'ADN des tissus racinaires de la plante additionné à de l'ADN des communautés microbiennes endophytes (symbiotes et microorganismes endophytes) et adhérant à la surface des tissus racinaires (rhizoplan).

Dans leur étude, Haichar et al (2008) n'avaient pas fractionné l'ADN du compartiment racinaire et avaient analysé la structure génétique des communautés bactériennes sur cet ADN total. Nos résultats démontrent que, globalement, les deux fractions racinaires correspondant théoriquement aux communautés microbiennes actives et non actives ont une structure génétique similaire. Ce résultat suggère que le fractionnement réalisé ne différencie pas deux communautés ^{12}C et ^{13}C , mais correspond davantage à de l'ADN essentiellement ^{13}C ayant des propriétés de densité différentes (ADN génomique ayant des teneurs en C différentes, ADN de plante dégradé lors de l'extraction qui génère un gradient de densité, ADN microbien de faible teneur isotopique,...). Dans ce compartiment, l'ensemble des communautés microbiennes sont essentiellement actives.

Des différences nettes ressortent, cependant, entre les compartiments rhizosphériques. Dans notre étude, la structure génétique des communautés microbiennes inactives du sol rhizosphérique se distingue significativement des communautés actives ou inactives de la racine, quel que soit le génotype. Cela peut s'expliquer par le fait que les microorganismes du

compartiment racinaire, interagissant plus ou moins intimement avec la plante, développent une structure de communauté différente des microorganismes du sol qui n'ont aucun lien avec la plante durant la période d'interaction considérée (van der Heijden et al 2008 ; Wardle et al 2004).

A l'inverse, la part active du sol rhizosphérique a une structure de communauté bactérienne et fongique très proche de celles du compartiment racinaire, quelle que soit la fraction. Les microorganismes actifs présents dans le sol ont une structure de communauté proche des microorganismes racinaires ayant développé une interaction spécifique avec la plante ou étant simplement installés au niveau des racines. En effet, certains groupes microbiens, utilisant les rhizodépôts au niveau de la racine, sont également présents dans le sol. Chez *M. truncatula*, par exemple, la bactérie mutualiste, *Pseudomonas fluorescens*, a la capacité de s'établir dans ces deux compartiments (Lepinay et al 2012 ; Lugtenberg et al 2002 ; Sanchez et al 2004). De plus, Haichar et al (2008) montrent que plusieurs groupes bactériens sont capables de dégrader à la fois le carbone frais fourni au niveau des racines et le carbone plus ancien libéré dans le sol.

Les communautés actives du sol rhizosphérique présentent une structure génétique intermédiaire entre les communautés inactives et les communautés actives ou inactives de la racine. Ce résultat suggère un continuum entre la racine et les fractions actives puis inactives du sol rhizosphérique. Il y a donc bien un gradient d'utilisation des composés carbonés de la plante.

Comme cela a été décrit précédemment, les microorganismes présents dans la racine (endophytes) et fixés sur la racine (rhizoplan) sont les premiers à bénéficier des composés marqués libérés par la plante et se développent principalement grâce à cette source de nutriment. Dans un second temps, les microorganismes du sol rhizosphérique reçoivent les composés qui n'ont pas été utilisés par les microorganismes de la racine et bénéficient donc de moins de ^{13}C (Lynch & Whipps 1990). Autrement dit, les microorganismes actifs de la rhizosphère se situent au plus près de leur ressource en nutriments. La part active de la communauté microbienne se situe donc logiquement, en majorité, au niveau des racines (Nguyen 2003). Cela confirme les données réalisées à l'échelle de la communauté totale (Mougel et al 2006).

Ainsi, concernant les bactéries du sol rhizosphérique, la structure de la communauté active est différente de la communauté inactive ce qui peut s'expliquer par le fait que dans le sol où les microorganismes sont moins en contact avec la plante ce sont des bactéries très précises qui, de par leur utilisation des exsudats racinaires marqués, vont développer une

structure spécifique (Flynn et al 2009 ; Gamfeldt et al 2008). En revanche, concernant les champignons, le fait d'utiliser ou non les exsudats racinaires libérés dans le sol rhizosphérique n'affecte pas la structure génétique. L'hypothèse pouvant être émise est que le réseau d'hyphes fongiques qu'ils développent largement autour de la plante (Simard et al 2012) ne permet pas de différencier génétiquement une structure active et inactive dans le sol.

Structure de la communauté microbienne active et inactive au sein de la rhizosphère de *M. truncatula* en présence ou non des symbiotes

En ce qui concerne l'effet du symbiote sur la structure de la communauté microbienne, il faut prendre en compte le compartiment rhizosphérique et le type de microorganismes.

Ainsi, dans la racine, la structure de la communauté fongique est influencée par le génotype. Lorsque la plante interagit avec les symbiotes, la structure de la communauté change. L'effet lié à la présence des symbiotes prime donc sur le fait de faire partie ou non de la part active de la communauté. En revanche, la structure de la communauté bactérienne est influencée par la présence des symbiotes, uniquement concernant la part active de la communauté.

Ce résultat rejoint les constatations faites dans l'article de Offre et al (2007) qui montre que chez *M. truncatula*, certains groupes bactériens sont préférentiellement associés aux racines lorsque le symbiote mycorhizien est présent. Il constate donc, dans son étude, qu'en présence des symbiotes (génotype J5) la structure de la communauté bactérienne est spécifique, et diffère du génotype mutant TRV25 dépourvu de symbiotes.

Cela s'ajoute au fait que, concernant le génotype TRV25 qui n'interagit pas avec des symbiotes, la structure de sa communauté bactérienne active dans la racine est différente de celle de son sol rhizosphérique. Une hypothèse possible est donc que, pour J5, la modification de structure apportée par les symbiotes au niveau des racines entraîne une similitude avec la structure bactérienne du compartiment sol.

Or, certains travaux ont montrés que les champignons mycorhiziens de types arbusculaires (AMF), comme le sont les champignons symbiotiques du genre *Glomus*, forment un réseau d'hyphes qui favorise l'implantation et la propagation de certaines bactéries (Bianciotto & Bonfante 2002 ; Bonfante & Anca 2009).

Ainsi, les symbiotes de *M. truncatula* du genre *Glomus*, peuvent favoriser la migration et l'implantation de bactéries, initialement situées au niveau du sol rhizosphérique, dans le compartiment racinaire. Cela pourrait expliquer qu'au moment où le prélèvement est réalisé, après 71 jours de croissance, la structure de la communauté bactérienne soit identique entre la

racine et le sol rhizosphérique. De plus, pour TRV25, le symbiote n'offre pas cette niche écologique favorable aux bactéries du sol. En conséquence, la structure de la part active de la communauté bactérienne est différente entre le sol et la racine.

Il faut tout de même noter qu'avec ce type d'enrichissement en ^{13}C de la communauté microbienne, via la plante, seuls sont ciblés les microorganismes qui utilisent les composés carbonés marqués fournis par la plante au moment de l'analyse. Or, la structure et la composition des communautés microbiennes du sol varient en fonction du stade de développement de la plante (Mougel et al 2006). Ce ne sont pas toujours les mêmes microorganismes qui utilisent les composés au cours de la croissance de la plante, principalement en raison des variations dans la composition des exsudats racinaires. Le stade de croissance et de développement végétal influence la quantité et la nature des composés libérés par la plante (Kuzyakov & Domanski 2000 ; Lynch & Whipps 1990 ; Yu et al 2012). Les analyses ADN SIP ne prennent donc pas en compte les microbes qui ont utilisé les composés marqués plus tôt au cours du développement de la plante. De plus, le fait que ce soit un marquage isotopique long, sur 71 jours, entraîne un biais dans la détection d'ADN microbien marqué (Haichar et al 2008). Ainsi, si des microorganismes consomment des métabolites marqués au ^{13}C , qui ont été produits par des microbes ayant utilisés les composés marqué libérés par la plante, alors ces microbes seront comptabilisé comme marqués. Ces derniers n'auront pourtant pas interagit directement avec la plante et ne font pas partie de la part active de la communauté en interaction directe avec la plante. Etant donné la forte densité et diversité microbienne du sol (Curtis et al 2002 ; Horner-Devine et al 2003), aucune étude n'a permis de quantifier cette part de la communauté microbienne utilisant les métabolites secondaires.

Globalement, les microbes qui utilisent les composés carbonés libérés par la plante, et qui se situent dans la racine, voient la structure de leur communauté modifiée par la présence des symbiotes. Cette influence est plus forte pour les champignons.

Dans le sol rhizosphérique, cependant, la présence du symbiote n'influence pas la structure des communautés microbiennes. La structure de la communauté bactérienne est influencée uniquement par le fait que les microorganismes utilisent ou non les exsudats racinaires. Enfin, la structure de la communauté fongique ne varie pas significativement quel que soit le génotype ou l'implication des microbes dans l'utilisation des composés libérés par la plante. Cela peut s'expliquer par l'éloignement par rapport à la racine et donc par rapport aux symbiotes qui fait que ces derniers n'influencent pas la structure des communautés dans ce compartiment sol.

En résumé, à mesure que les microbes se rapprochent de la plante (racine) ou interagissent avec elle (part active H), l'influence des symbiotes sur la structure de la communauté est plus importante. Les champignons (Verbruggen et al 2012) et bactéries (van der Heijden et al 2006a) symbiotiques connus pour leurs effets bénéfiques sur la productivité et la diversité des espèces végétales semblent donc agir directement sur la plante mais également indirectement, via leur rôle sur le reste de la communauté microbienne (van der Heijden et al 2008).

Le fait de coupler des analyses ARISA de structure de communauté avec un marquage isotopique, en utilisant la méthode ADN SIP, a permis d'observer les effets de la localisation dans la rhizosphère et de la présence des symbiotes dans la part active de la communauté microbienne.

En conclusion, lorsqu'il s'agit de l'influence du compartiment étudié sur la structure de la part active de la communauté, celle-ci dépend du génotype. Pour le génotype J5, la structure génétique des communautés bactérienne et fongique actives, dans la racine, n'est pas significativement différente du sol rhizosphérique. Il en est de même pour la structure génétique de la communauté fongique active du génotype TRV25. En revanche, chez TRV25, la structure génétique de la communauté bactérienne active, dans la racine, diffère de celle du sol rhizosphérique.

Les résultats de cette étude montrent également que la présence de symbiotes impacte la structure des communautés bactériennes et fongiques dans le compartiment racinaire. La structure de la part active des communautés bactériennes et fongiques est donc différente entre les deux génotypes dans ce compartiment, mais identique dans le compartiment sol rhizosphérique.

Il serait intéressant, pour mieux comprendre ces différences ou similitudes de structure de coupler ces analyses ADN SIP avec une étude de composition des communautés microbiennes (Maron et al 2011 ; Neufeld et al 2007a,b ; Uhlik et al 2009). Un suivi au cours du temps de l'évolution de la structure et composition des communautés microbiennes permettrait de comprendre au mieux les interactions au cours du temps entre les symbiotes et le reste de la communauté. Butler et al (2003) montrent dans leur étude que les différences temporelles, dans la composition de la communauté microbienne, représentent un facteur de variation plus important que les différences spatiales. Une telle cinétique permettrait, notamment, d'éviter les biais liés au marquage long et de voir comment évolue la communauté microbienne au cours de la croissance de *M. truncatula*.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier J. Lévêque et O. Mathieu pour les analyses isotopiques et M. Péan ainsi que les membres du CEA de Cadarache pour la réalisation de l'enrichissement isotopique, du semis jusqu'à la récolte des plantes.

BIBLIOGRAPHIE

- Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G.V., Höfte, M., Lemanceau, P. & Cooke, M. (2007) Foreword. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 241-242.
- Bardgett, R.D., Bowman, W.D., Kaufmann, R. & Schmidt, S.K. (2005) Linking aboveground and belowground communities: a temporal approach. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 634-641.
- Bernard, L., Mougél, C., Maron, P.A., Nowak, V., Lévêque, J., Henault, C., Haichar, F.Z., et al. (2007) Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ^{13}C -labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology*, 9, 752-764.
- Bianciotto, V. & Bonfante, P. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 365-371.
- Bonfante, P. & Anca, I.A. (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63, 363-383.
- Boutton, T.W. (1991) Stable carbon isotope ratios of natural materials. I. Sample preparation and mass spectrometric analysis. In: Carbon isotope techniques. (Ed. By Coleman, D.C. & Fry, B.). Academic Press, New York.
- Boutton, T.W. (1996) Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: Mass Spectrometry of Soils. (Ed. By Boutton, T.W. & Yamasaki, S.I.). Marcel Dekker, New York.
- Brencic, A. & Winans, S.C. (2005) Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 155-194.
- Butler, J.L., Williams, M.A., Bottomley, P.J. & Myrold, D.D. (2003) Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Applied in Environmental Microbiology*, 69, 6793-6800.
- Cadisich, G., Espana, M., Causey, R., Richter, M., Shaw, E., Morgan, J.A.W., Rahn, C., et al. (2005) Technical considerations for the use of ^{15}N -DNA stable-isotope probing for functional microbial activity in soils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 1424-1428.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Varma Penmetsa, R., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., et al. (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *The Plant Cell*, 12, 1647-1665.

- Curtis, T.P., Sloam, W.T. & Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 10494-10499.
- Denison, R.F. & Kiers, E.T. (2004a) Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 187-193.
- Drigo, B., Anderson, I.C., Kannangara, G.S.K., Cairney, J.W.G. & Johnson, D. (2012) Rapid incorporation of carbon from ectomycorrhizal mycelial necromass into soil fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 49, 4-10.
- Dunford, E. A. & Neufeld, J. D. (2010) DNA stable-isotope probing (DNA-SIP). *Journal of Visualized Experiments*, 42, 1-6.
- Eparvier, A., Lemanceau, P. & Alabouvette, C. (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 177-184.
- Flynn, D.F.B., Gogol-Prokurat, M., Nogeire, T., Molinari, N., Richers, B.T., Lin, B.B., Simpson, N., et al. (2009) Loss of functional diversity under land use intensification across multiple taxa. *Ecology Letters*, 12, 22-33.
- Friedrich, M.W. (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 59-66.
- Gamfeldt, L., Hillebrand, H. & Jonsson, P.R. (2008) Multiple functions increase the importance of biodiversity for overall ecosystem functioning. *Ecology*, 89, 1223-1231.
- Haichar, F.E.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., et al. (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2, 1221-1230.
- van der Heijden, M.G.A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T.R., Rutten, M., van Logtestijn, R. & Staehelin, C. (2006a) Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 178-187.
- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & van Straalen, N.M. (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296-310.
- Hobbie, J. & Hobbie, E. (2006) ^{15}N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in Arctic tundra. *Ecology*, 87, 816-822.

- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. & Bohannan, B.J.M. (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6, 613-622.
- Houlden, A., Timms-Wilson, T.M., Day, M.J. & Bailey, M.J. (2008) Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 193-201.
- Jia, Z. & Conrad, R. (2009) Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 11, 1658-1671.
- Kuzyakov, Y. & Domanski, G. (2000) Carbon input by plants into the soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 421-431.
- Lambers, H., Mougél, C., Jaillard, B. & Hinsinger, P. (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*, 321, 83-115.
- Lee, C.G., Watanabe, T., Sato, Y., Murase, J., Asakawa, S. & Kimura, M. (2011) Bacterial populations assimilating carbon from ¹³C-labeled plant residue in soil: Analysis by a DNA-SIP approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 814-822.
- Lepinay, C., Rigaud, T., Salon, C., Lemanceau, P. & Mougél, C. (2012) Interaction between *Medicago truncatula* and *Pseudomonas fluorescens*: Evaluation of costs and benefits across an elevated atmospheric CO₂. *Plos One*, 7, e45740.
- Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng, T.F.C. & Bloemberg, G.V. (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 373-383.
- Lynch, J.M. & Whipps, J.M. (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129, 1-10.
- Manefield, M., Whiteley, A.S. & Bailey, M.J. (2004) What can stable isotope probing do for bioremediation ? *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 163-166.
- Maron, P.A., Mougél, C. & Ranjard, L. (2011) Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 403-411.
- Mougél, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C. & Lemanceau, P. (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist*, 170, 165-175.
- Neufeld, J.D., Dumont, M.G., Vohra, J. & Murrell, J.C. (2007a) Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology*, 53, 435-442.

- Neufeld, J.D., Wagner, M. & Murrell, J.C. (2007b) Who eats what, where and when ? Isotope labelling experiments are coming of age. *The ISME Journal*, 1, 103-110.
- Nguyen, C. (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23, 375-396.
- Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P. & Mougél, C. (2007) Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 913-921.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S. & Downie, J.A. (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119-144.
- Pivato, B., Gamalero, E., Lemanceau, P. & Berta, G. (2008) Colonization of adventitious roots of *Medicago truncatula* by *Pseudomonas fluorescens* C7R12 as affected by arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Letters*, 289, 173-180.
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougél, C., Lemanceau, P. & Berta, G. (2009) Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19, 81-90.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R. & Murrell, C. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403, 646-649.
- Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougél, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. & Chaussod, R. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5, 1111-1120.
- Sagan, M., Morandib, D., Tarenghib, E. & Due, G. (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after y-ray mutagenesis. *Plant Science*, 111, 63-71.
- Sanchez, L., Weidmann, S., Brechenmacher, L., Batoux, M., van Tuinen, D., Lemanceau, P., Gianinazzi, S., et al. (2004) Common gene expression in *Medicago truncatula* roots in response to *Pseudomonas fluorescens* colonization, mycorrhiza development and nodulation. *New Phytologist*, 161, 855-863.
- Sanchez, L., Weidmann, S., Arnould, C., Bernard, A.R., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (2005) *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* trigger DMI3-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 139, 1065-1077.
- Schmeisser, C., Steele, H. & Streit, W.R. (2007) Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 955-962.

- Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J. & Teste, F.P. (2012) Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews*, 26, 39-60.
- Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. & Olivier, J.M. (1997) Ade-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistical Computing*, 7, 75-83.
- Uhlik, O., Jecná, K., Leigh, M.B., Macková, M. & Macek, T. (2009) DNA-based stable isotope probing: a link between community structure and function. *Science of the Total Environment*, 407, 3611-3619.
- Verbruggen, E., van der Heijden, M.G.A., Rillig, M.C. & Kiers, E.T. (2012) Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytologist*, 1-6.
- Wackett, L.P. (2004) Stable isotope probing in biodegradation research. *Trends in Biotechnology*, 22, 153-154.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., van der Putten, W.H. & Wall, D.H. (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304.
- Werth, M. & Kuzyakov, Y. (2010) ¹³C fractionation at the root–microorganisms–soil interface: A review and outlook for partitioning studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1372-1384.
- Young, N.D., Mudge, J. & Ellis, T.N. (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 199-204.
- Yu, L., Nicolaisen, M., Larsen, J. & Ravnkov, S. (2012) Succession of root-associated fungi in *Pisum sativum* during a plant growth cycle as examined by 454 pyrosequencing. *Plant and Soil*, 358, 225-233.
- Zancarini, A., Mougél, C., Terrat, S., Salon, C. & Munier-Jolain, N. (2012) Combining ecophysiological and microbial ecological approaches to study the relationship between *Medicago truncatula* genotypes and their associated rhizosphere bacterial communities. *Plant and Soil*.
- Zancarini, A., Lepinay, C., Burstin, J., Duc, G., Lemanceau, P., Moreau, D., Munier-Jolain, N., et al. (2013) Combining molecular microbial ecology with ecophysiology and plant genetics for a better understanding of plant-microbial communities interactions in the rhizosphere. In: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (Ed. By de Bruijn, F.J.). Wiley-Blackwell, *In press* 2013.

DONNEES SUPPLEMENTAIRES

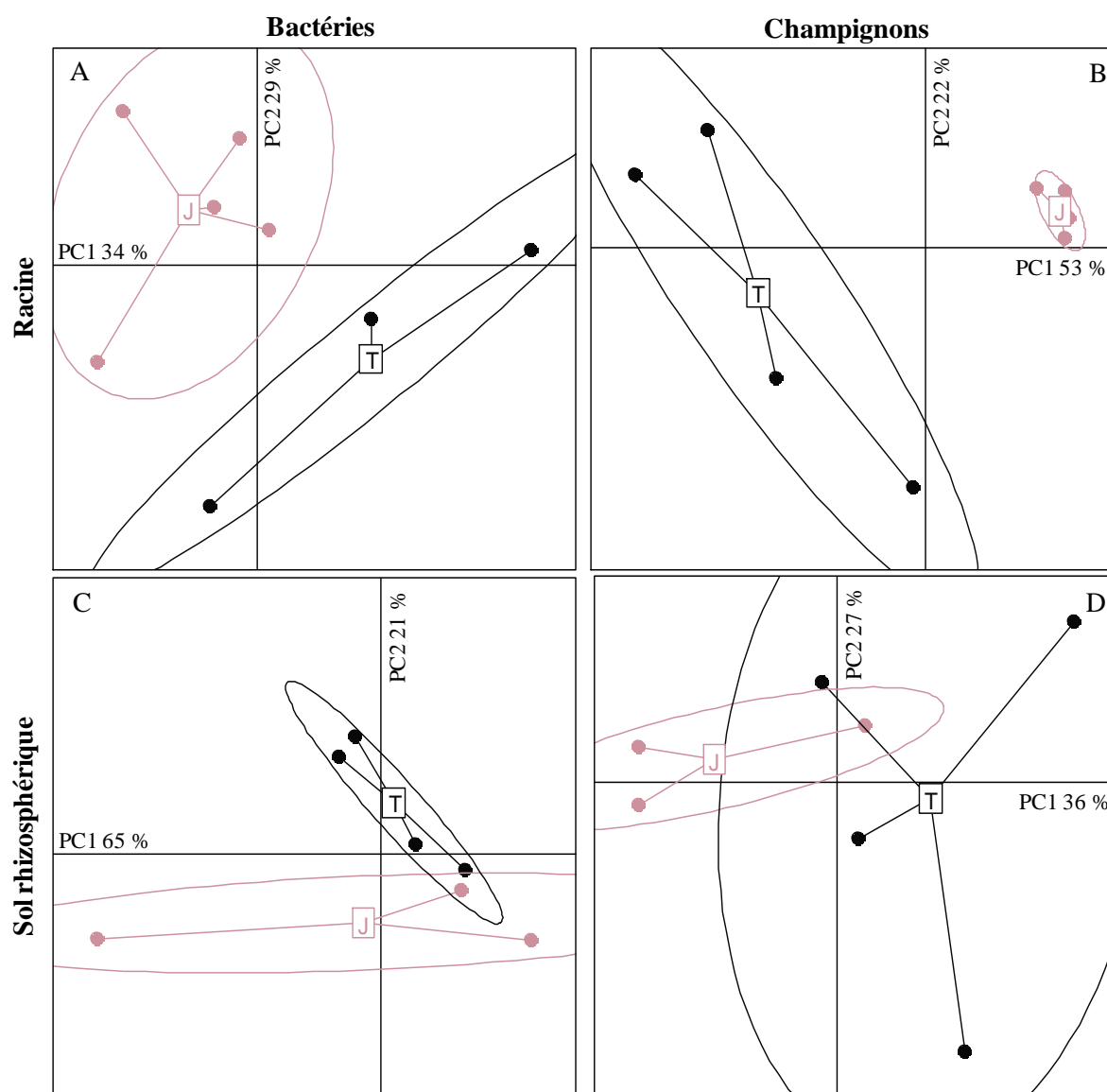


Figure 3.S1 Analyse en composantes principales de la structure génétique bactérienne (A,C) et fongique (B,D) de la part active de la communauté microbienne rhizosphérique (fraction d'ADN lourde) de *Medicago truncatula*, pour les géotypes J5 (J) et TRV25 (T), des compartiments racine (A,B) et sol rhizosphérique (C,D), en condition enrichie en ^{13}C . Les ellipses entourant chaque ensemble de réplicats correspondent à un intervalle de confiance de 90 %.

Conclusion du Chapitre III

Ce dernier chapitre permet de préciser les interactions entre la plante et les microorganismes telluriques et de cibler les microbes qui sont impliqués. Le lien trophique entre les deux partenaires est mis en évidence par le suivi de l'élément carbone 13. Cette méthode de marquage isotopique au ^{13}C a permis de montrer, qu'au sein de la rhizosphère, il y a une organisation spatiale des communautés microbiennes qui se fait par rapport à la plante d'une part. En effet, une partie seulement de cette communauté interagit avec la plante. L'interaction est plus ou moins forte selon la localisation des microbes dans la rhizosphère car, celle-ci, conditionne la proximité avec la plante. D'autre part, cette structuration se fait en fonction des interactions entre les microorganismes eux-mêmes. Au sein de cette communauté microbienne qui utilise les composés carbonés libérés par la plante, les symbiotes qui s'associent de façon étroite aux racines de *M. truncatula* influencent la structure de la communauté microbienne située dans la racine (Figure 3.6).

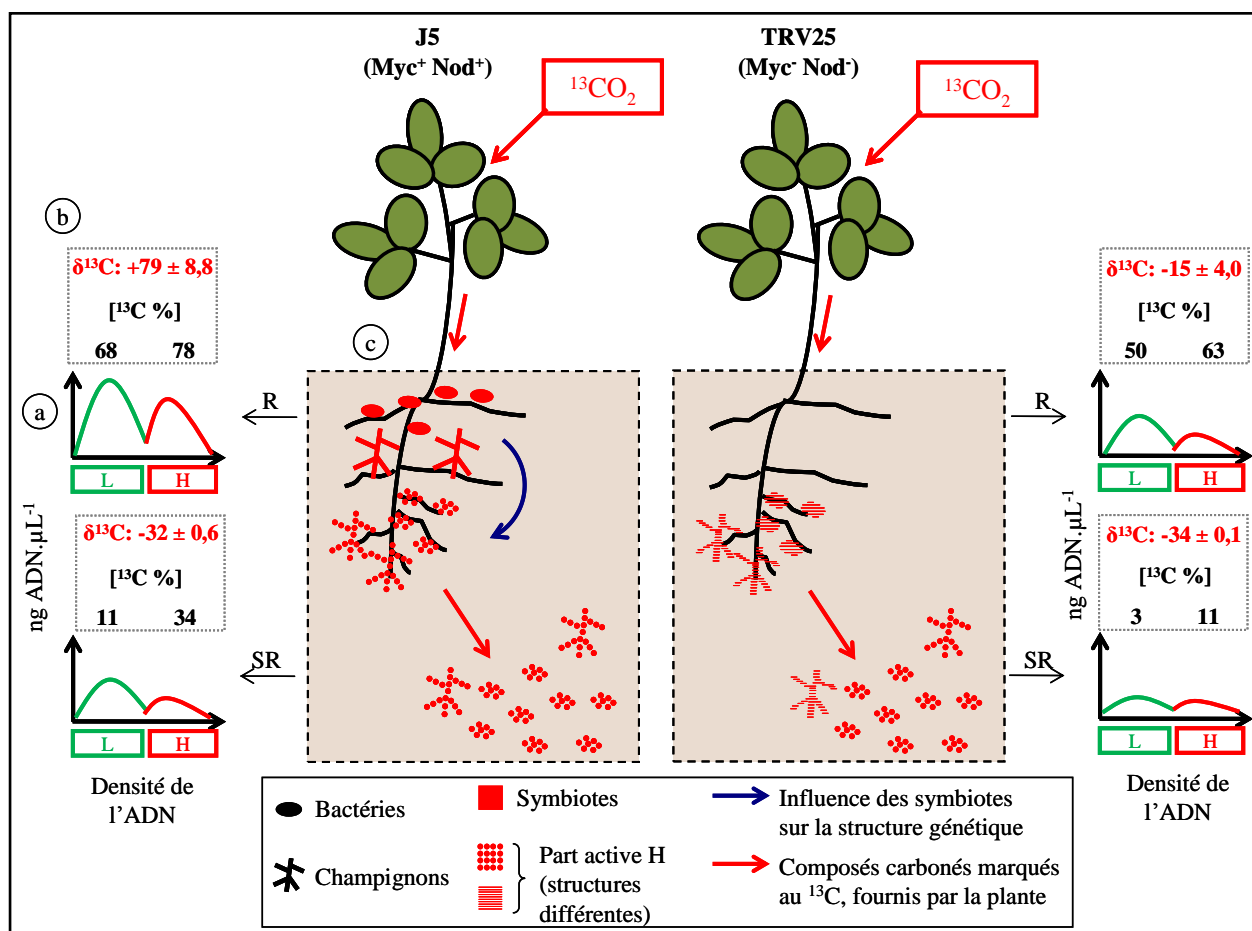


Figure 3.6 Bilan de l'analyse ADN SIP, avec l'élément ^{13}C , effectuée au niveau de l'interaction entre deux génotypes de *Medicago truncatula*, J5 et TRV25, et leur communauté microbienne rhizosphérique. Le génotype sauvage J5 est Myc⁺ Nod⁺, c'est-à-dire qu'il interagit avec des rhizobactéries et des champignons mycorrhizogènes et le génotype TRV25 est son mutant dépourvu de symbiotes (Myc⁻ Nod⁻). Pour chaque compartiment, racine (R) ou sol rhizosphérique (SR), des deux génotypes, trois données sont représentées: a) les courbes d'abondances microbiennes distinguant les fractions d'ADN légères (L) et lourdes (H), b) les données du $\delta^{13}\text{C}$ moyen (\pm erreur type) (sans distinction des fractions L et H) ainsi que le pourcentage de ^{13}C dans chacune des fractions L et H, et enfin c) une représentation schématique de la structure des communautés bactériennes et fongiques. Globalement, la biomasse microbienne, le $\delta^{13}\text{C}$ et le pourcentage de ^{13}C augmentent avec la proximité à la racine et lorsque la plante interagit avec des symbiotes. Concernant la structure génétique des communautés bactériennes et fongiques, les symbiotes jouent un rôle dans le compartiment racinaire uniquement. En présence des symbiotes (pour J5), la structure de la part active de la communauté bactérienne et fongique ne varie pas entre la racine et le sol. En l'absence

d'interactions symbiotiques (pour TRV25) la communauté microbienne racinaire est différente. Cependant, dans le sol rhizosphérique, la structure de la communauté bactérienne active est la même que pour le génotype J5 et la structure de la communauté fongique est très proche également. En l'absence de symbiotes, la structure génétique de la communauté bactérienne diffère entre les compartiments racine et sol rhizosphérique, cependant la structure fongique est très proche.

Bien que cette étude apporte des éléments de compréhension sur le fonctionnement de la part active de la communauté microbienne, les informations obtenues concernent la structure génétique. Afin de préciser ces observations, des analyses de composition, telles que celles réalisées suite au pyroséquençage 454, permettraient d'identifier les groupes microbiens interagissant avec la plante ainsi que leur abondance relative, de même que ceux influencés par les symbiotes.

CONCLUSION GENERALE DE LA THESE

CONCLUSION GENERALE DE LA THESE

Ce travail de thèse visait à mieux comprendre les interactions entre deux compartiments, essentiels au fonctionnement des écosystèmes, les plantes et les microorganismes telluriques. Ces interactions, fondamentales à la réalisation de nombreux services écosystémiques, sont basées sur des liens trophiques mettant principalement en jeu l'élément carbone. A partir de ces données contextuelles, largement reconnues dans le domaine scientifique, que ce soit dans les domaines de l'agroécologie, l'environnement ou l'alimentation, un protocole expérimental a été mis en place. Le principe était de conceptualiser l'interaction entre plantes et microbes par des coûts et bénéfices pour chaque partenaire puis d'appliquer à ce système d'interaction des facteurs de modulation pour chacun. Ce protocole a été inspiré par le contexte mondial actuel qui est celui des changements globaux qui affectent nos écosystèmes. Ainsi, les variations mises en œuvre sont une hausse de la concentration en dioxyde de carbone (CO₂) atmosphérique et une réduction de la diversité des microorganismes du sol. Les gaz à effets de serres, émis en grande quantité dans l'atmosphère, et en particulier le CO₂, posent de nombreux problèmes écosystémiques. De même, les applications de pesticides et d'intrants ou les systèmes intensifs de culture souvent pratiqués conduisent à une réduction de la diversité microbienne.

Le choix du système plantes-microbes est donc justifié par les enjeux mondiaux actuels. En effet, ces préoccupations peuvent se résumer en une production alimentaire plus importante et de bonne qualité afin de répondre aux besoins croissants de la population mondiale, et cela en respectant l'environnement donc en optant pour une agriculture durable. Or, des systèmes d'agriculture durable incluent l'utilisation des microbes du sol pour permettre la croissance et la santé des plantes. Ainsi, pour mieux gérer ce type d'agriculture il faut comprendre comment fonctionnent les plantes, les microbes telluriques et leurs interactions.

Cette étude s'est basée principalement sur la légumineuse modèle *Medicago truncatula*, la luzerne tronquée. Cette plante se rapproche génétiquement de la plupart des légumineuses utilisées dans l'alimentation humaine (pois, soja, ...) et présente donc un intérêt agroécologique. Elle est aussi bien connue pour ces interactions avec des microorganismes symbiotiques, une bactérie fixatrice d'azote, *Sinhorizobium* et un champignon endomycorhizogène à arbuscules du genre *Glomus*.

Concernant le partenaire microbien, les interactions ont été peu à peu complexifiées afin de se rapprocher de conditions naturelles. Dans un premier temps, *M. truncatula* a été mise en interaction avec un seul microorganisme (Chapitre I), la bactérie mutualiste, non symbiotique, *Pseudomonas fluorescens*. Ensuite, une communauté microbienne dans son ensemble a été utilisée. Cela a permis, entre autre, d'inclure dans le système d'interaction plantes-microbes un aspect non pris en compte dans le premier chapitre et pourtant essentiel dans le fonctionnement de cette relation: les interactions entre microorganismes eux-mêmes. La diversité de microbes présents dans le sol ne permettant pas d'étudier correctement ces interactions, les microorganismes les plus connus et les plus importants vis-à-vis de la plante ont été utilisés : les symbiotes. Ainsi, les interactions microbes-microbes ont consisté en l'étude des interactions entre microorganismes symbiotiques et non symbiotiques (Chapitre II) et en l'étude des effets des symbiotes sur la structure génétique des microorganismes non symbiotiques (Chapitre III).

La synthèse bibliographique a permis de définir le cadre scientifique correspondant au fonctionnement de ces interactions. Ainsi, l'évidence du lien trophique existant et de son importance vis-à-vis de l'écosystème, mais aussi le rôle fondamental que jouent indépendamment les plantes et les microbes du sol ont pu être explicités. Cette partie avait pour but de faire comprendre l'intérêt d'étudier ces interactions et les outils nécessaires pour les étudier.

Dans un premier temps, il a donc été entrepris de partir sur une base simple en étudiant une interaction de type génotype plante x génotype microbe (Chapitre I). Peu d'études utilisent des systèmes si simplifiés du fait de la difficulté de contrôler microbiologiquement le sol durant la croissance de la plante. Un système simplifié, bien que loin de la réalité, permet néanmoins de contrôler tous les paramètres hormis ceux dont on veut voir les effets. Les systèmes microbiologiquement contrôlés, spécialement développés pour cette expérimentation, ont permis une telle étude. Il a alors été possible de mesurer les variations de coûts et bénéfices pour chaque partenaire. Dans un tel contexte, les effets d'une augmentation de la concentration en CO₂ atmosphérique, sur l'équilibre des coûts et bénéfices qui régit l'interaction, ont été suivis au cours de la croissance de la plante. La variation observée n'était pas forcément celle attendue. Il s'est avéré qu'une déstabilisation en faveur de la plante a été

remarquée. Cette conséquence négative pour la bactérie *P. fluorescens* n'a cependant été que transitoire. L'équilibre s'est par la suite rétabli.

Ce premier chapitre a donc permis de constater que la plante bénéficie d'une hausse du CO₂ de par la production accrue de graines et leur meilleure qualité nutritionnelle. La bactérie a rencontré, en revanche, une période défavorable avec une réduction de biomasse. Ces résultats posent la question du maintien ou non de cette interaction bénéfique à la plante étant donné la capacité d'évolution rapide des microorganismes. Dans un tel contexte d'enrichissement en CO₂ atmosphérique, la bactérie pourrait, à plus long terme et dans des conditions de compétition avec d'autres microbes (en milieu naturel), ne plus maintenir cette interaction.

Il a, par la suite, été envisagé de mener la même expérimentation en diminuant la concentration en CO₂ atmosphérique afin de confirmer, par la situation opposée, le résultat obtenu. Ce type de régulation atmosphérique du CO₂ est plus complexe à mettre en œuvre et bien que potentiellement intéressante s'éloignerait largement de la réalité. De plus, d'autres microbes auraient pu être ajoutés mais le maintien d'un milieu gnotobiotique et les mesures de coûts et bénéfices auraient été plus complexes. En conséquence, il a été choisi de privilégier le rapprochement avec un système naturel.

L'utilisation d'une communauté microbienne dans son ensemble a été réalisée par extraction de la communauté microbienne du sol de Montpellier (Chapitre II). Ce sol est riche en matière organique et microorganismes symbiotiques et contient donc une microflore abondante. La variation apportée aux interactions s'est faite du côté des microbes dans cette deuxième expérimentation. Un des facteurs du changement global, la menace de la biodiversité, a été pris en considération en diluant la diversité de la communauté microbienne de façon à créer un gradient de diversité. De plus, l'étude des interactions entre microbes a été intégrée du fait de l'implication des symbiotes. Pour cela, deux autres espèces végétales ont été utilisées, en plus de *M. truncatula*, dont on sait qu'elle possède deux symbiotes ; il s'agit de *Brachypodium distachyon*, interagissant seulement avec le symbiote mycorhizien *Glomus*, et *Arabidopsis thaliana*, n'établissant aucune interaction symbiotique. En disposant ainsi d'un gradient de diversité microbienne et d'un gradient de dépendance symbiotique, les variations de coûts et bénéfices pour les plantes et leurs symbiotes ont été mesurées. Concernant les microorganismes, la composition de la communauté microbienne non symbiotique a été analysée, grâce à la technique de pyroséquençage, pour chaque niveau de diversité. Cette étude a révélé des points intéressants qui sont l'intérêt de la diversité microbienne pour la

croissance symbiotique et également pour les plantes selon leur dépendance vis-à-vis des symbiotes. Autrement dit, plus une plante est dépendante des symbiotes pour sa croissance, sa survie, et sa reproduction, comme c'est le cas de *M. truncatula*, et plus elle souffre de la dilution de diversité.

Ce deuxième chapitre a donc confirmé le rôle des symbiotes et la dépendance qui se crée entre les plantes et leur symbiotes. Cependant, les coûts liés à la symbiose sont mis en avant du fait que *B. distachyon*, qui n'a besoin que d'un symbiote, va bénéficier de la diminution de densité de celui-ci. Ce travail a permis de mettre en avant un point plutôt inattendu, le fait qu'une forte diversité microbienne n'est pas indispensable à toutes les espèces végétales.

Les conclusions obtenues au terme de ce second chapitre ont soulevé la question de la composition et de la provenance de cette communauté microbienne non symbiotique plus ou moins importante pour la plante et en interaction avec les symbiotes. Il serait intéressant de voir, dans un premier temps, comment est structurée cette communauté et quels sont les microbes qui jouent réellement un rôle et utilisent les composés carbonés libérés par la plante.

Pour répondre à cette question, une expérimentation avec la méthode ADN SIP a été entreprise. Cette méthode a consisté à fournir du CO₂ atmosphérique marqué avec l'isotope ¹³C à la plante puis à cibler dans la rhizosphère l'ADN microbien marqué au ¹³C, autrement dit correspondant aux microorganismes ayant utilisé les composés marqués libérés par la plante. Afin de conserver dans l'analyse les interactions symbiotes versus reste de la communauté, deux géotypes de *M. truncatula* ont été utilisés : J5, le géotype sauvage avec ces deux symbiotes et TRV25, le géotype mutant dépourvu d'associations symbiotiques. En dissociant le compartiment racine du sol rhizosphérique, cette étude met en avant une influence des symbiotes sur la structure de la communauté microbienne de la racine. De plus, le fait qu'en présence du symbiote la structure de la part active de la communauté microbienne soit très proche entre la racine et le sol rhizosphérique soutient les observations faites dans le second chapitre de la thèse. En effet, chez *M. truncatula*, les symbiotes semblent employer le reste de la communauté microbienne du sol afin de jouer leur rôle envers la plante.

Ce dernier chapitre met concrètement en évidence le rôle des symbiotes sur le reste de la communauté. De même, au sein de la diversité microbienne importante pour *M. truncatula*, (Chapitre II) plusieurs groupes peuvent être distingués en fonction de la position des microbes

dans la rhizosphère, mais également en fonction du rôle qu'ils jouent car seulement une partie de cette communauté interagit réellement avec la plante (Chapitre III).

Ces trois Chapitres de thèse et le lien entre les différentes expérimentations sont résumés dans le schéma ci-dessous (Figure 4.1).

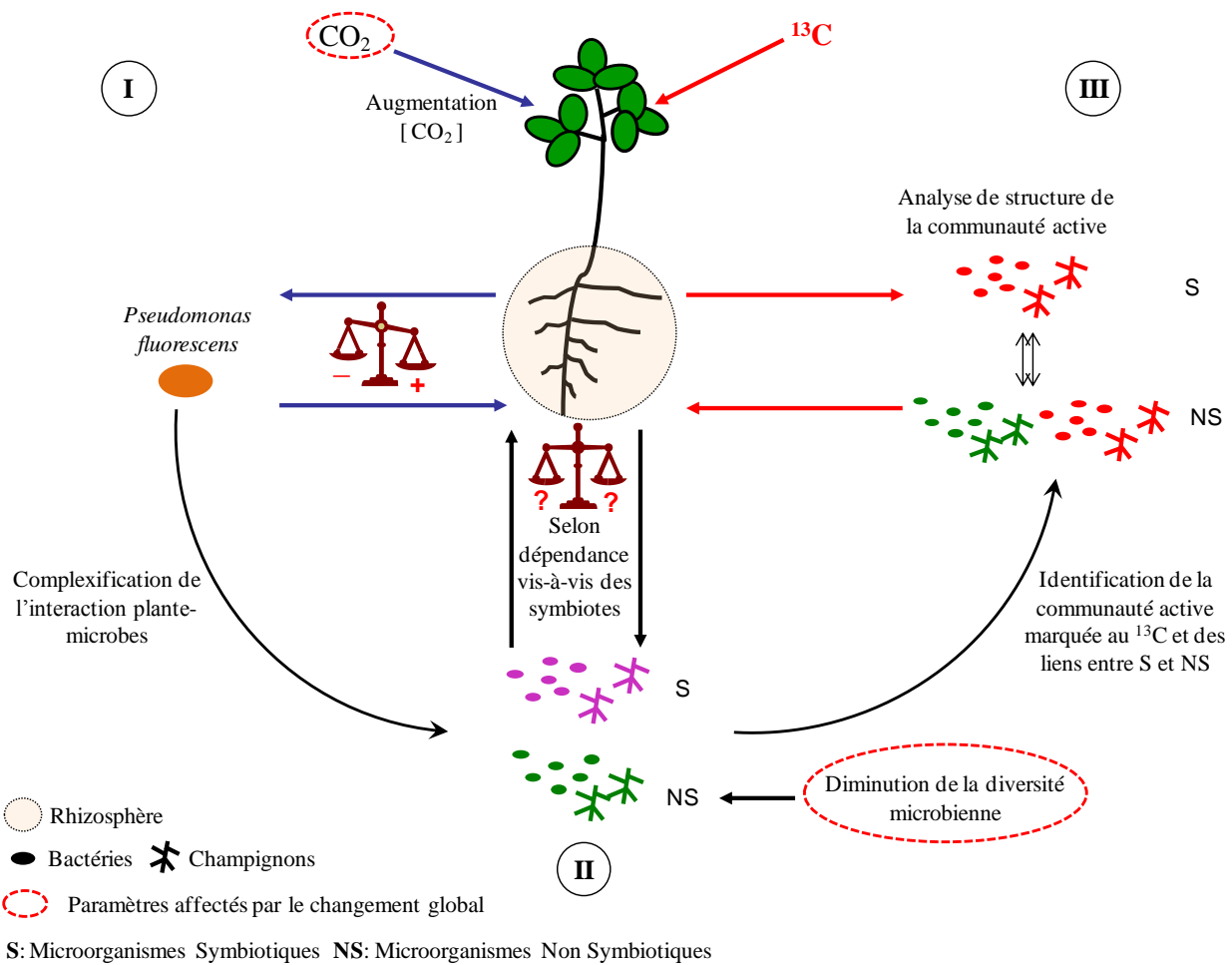


Figure 4.1 Bilan schématique des expérimentations conduites dans les chapitres I, II et III, afin de mieux comprendre les interactions plantes-microbes et microbes-microbes. I) La première expérience vise à étudier l'interaction entre *Medicago truncatula* et *Pseudomonas fluorescens* en condition de CO_2 augmenté. Le principal résultat est la déstabilisation des interactions en faveur de la plante. II) La deuxième expérience vise à étudier l'interaction de trois espèces végétales, *M. truncatula*, *Brachypodium distachyon* et *Arabidopsis thaliana*, avec une communauté microbienne rhizosphérique dont la diversité des microorganismes non symbiotiques a été diluée. L'effet de la dilution de diversité sur la croissance et la reproduction végétale dépend du type de plante et de sa dépendance vis-à-vis des symbiotes. III) Enfin, la troisième expérience a entraîné le marquage isotopique, au ^{13}C , des composés carbonés fournis à la communauté microbienne rhizosphérique afin d'en identifier la structure. Cette expérience a également permis de comprendre l'influence des symbiotes sur le reste de la communauté.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

Ce travail de thèse complète les études réalisées dans le but de comprendre le fonctionnement des interactions entre les microorganismes telluriques et les plantes. De nombreuses études ont ainsi fait l'état des lieux de la communauté microbienne rhizosphérique (Bever et al 2012 ; Brussaard et al 2007 ; van der Heijden et al 2008) et ce sont notamment focalisées sur les symbiotes (Denison & Kiers 2004a,b ; van der Heijden et al 2006a,b ; Rudgers et al 2004 ; Smith & Smith 2011). D'autres travaux ont permis de comprendre et de décrypter le fonctionnement de la plante et le rôle fondamental joué par l'élément carbone (Heller et al 1993 ; Luo 2007 ; Lynch & Whipps 1990 ; Nguyen 2003 ; Ziska & Bunce 2006). Sur la base des connaissances acquises sur chaque partenaire, des études, reliant les deux compartiments, se sont développées. Généralement, ces études entraînent une variation du côté de l'un ou l'autre des partenaires et mesurent les conséquences sur la plante ou sur les microorganismes (Drigo et al 2008 ; Eisenhauer et al 2012 ; Finzi et al 2006 ; Grace & Zhang 2006 ; Griffiths et al 2000 ; He et al 2012 ; Kuzyakov et al 2007).

Ce travail de thèse a, cependant, voulu apporter une vision complète du système en observant les effets de variations environnementales sur chaque partenaire de l'interaction. En se basant sur la force des liens trophiques qui associent ces deux compartiments, cette étude a apporté quelques éléments de réponse sur le fonctionnement de ces relations plantes-microbes et microbes-microbes, ayant lieu au sein de la rhizosphère. Ainsi, le comportement de ces interactions face à certains paramètres du changement global (hausse du CO₂ et réduction de la biodiversité) a été mis en évidence. Les conséquences pour les plantes et les microorganismes ont été mesurées avec une vision de biologie évolutive, prenant en compte, notamment, la croissance microbienne et la reproduction végétale. Des études de biologie moléculaire ont également apporté des éléments de réponse quant à l'organisation du compartiment rhizosphérique et au rôle des symbiotes.

Un aspect manquant de l'interaction trophique aurait été intéressant à prendre en compte, afin de compléter cette vision des interactions : l'ajout des analyses de composition des rhizodépôts produits par la plante. Cependant, de telles analyses sont complexes à mettre en œuvre car elles nécessitent de distinguer dans la rhizosphère les différents composants produits par les plantes et les microorganismes. De nouvelles techniques de biologie

moléculaires émergent, telles que des analyses de métagénomiques ou métaprotéomiques (Delmont et al 2011 ; Fierer et al 2012 ; Keiblinger et al 2012 ; Maron et al 2011 ; Simon & Daniel 2011 ; Terrat et al 2011), et ouvrent des pistes de recherches qui apporteraient une vision plus complète des interactions rhizosphériques. Mieux comprendre le fonctionnement du système plantes-microorganismes permettrait de nouvelles perspectives d'innovations, dans les domaines agricole, alimentaire et environnemental, dont la pérennisation dépend de ces interactions.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- A -

- Achard, F., Eva, H.D., Stibig, H-J., Mayaux, P., Gallego, J., Richards, T. & Malingreau, J-P. (2002) Determination of deforestation rates of the world's humid tropical forests. *Science*, 297.
- Agnew, P., Koella, J.C. & Michalakis, Y. (2000) Host life history responses to parasitism. *Microbes and Infection*, 2, 891-896.
- Ainsworth, E.A. & Rogers, A. (2007) The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell & Environment*, 30, 258-270.
- Albrechtova, J., Latr, A., Nedorost, L., Pokluda, R., Posta, K. & Vosatka, M. (2012) Dual inoculation with mycorrhizal and saprotrophic fungi applicable in sustainable cultivation improves the yield and nutritive value of onion. *The Scientific World Journal*, 2012, 1-8.
- Allison, S.D. & Martiny, J.B.H. (2008) Resistance , resilience , and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 11512-11519.
- Altieri, M.A. (2005) The myth of coexistence: why transgenic crops are not compatible with agroecologically based systems of production. *Bulletin of Science, Technology & Society*, 25, 361-371.
- Anderson, I.C. & Cairney, J.W.G. (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology*, 6, 769-779.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796-815.
- Arft, A., Walker, M., Gurevitch, J., Alatalo, J., Bret-Harte, M., Dale, M., Diemer, M., et al. (1999) Responses of tundra plants to experimental warming: meta-analysis of the international tundra experiment. *Ecological Monographs*, 69, 491-511.
- Arnone, J.A., Zaller, J.G., Spehn, E.M., Niklaus, P.A., Wells, C.E. & Körner, C. (2000) Dynamics of root systems in native grasslands: effects of elevated atmospheric CO₂. *New Phytologist*, 147, 73-85.
- Asghari, H.R. & Cavagnaro, T.R. (2012) Arbuscular mycorrhizas reduce nitrogen loss via leaching. *Plos One*, 7, e29825.

- B -

- Bago, B., Pfeffer, P.E. & Shachar-Hill, Y. (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology*, 124, 949-957.
- Baho, D.L., Peter, H. & Tranvik, L.J. (2012) Resistance and resilience of microbial communities--temporal and spatial insurance against perturbations. *Environmental Microbiology*, 14, 2283-2292.
- Bakker, P.A.H.M., Raaijmakers, J.M., Bloemberg, G.V., Höfte, M., Lemanceau, P. & Cooke, M. (2007) Foreword. *European Journal of Plant Pathology*, 119, 241-242.
- Bardgett, R.D., Bowman, W.D., Kaufmann, R. & Schmidt, S.K. (2005) Linking aboveground and belowground communities: a temporal approach. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 634-641.
- Barker, D.G., Bianchi, S., Blondon, F., Dattee, Y., Duc, G., Flament, P., Gallusci, P., et al. (1990) *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8, 40-49.
- Barnabás, B., Järgen, K. & Fehér, A. (2008) The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant, Cell and Environment*, 31, 11-38.
- Barraquio, W.L., Ladha, J.K. & Watanabe, I. (1983) Isolation and identification of N₂-fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Canadian Journal of Microbiology*, 29, 867-873.
- Battisti, A., Stastny, M., Netherer, S., Robinet, C., Schopf, A., Roques, A. & Larsson, S. (2005) Expansion of geographic range in the pine processionary moth caused by increased winter temperatures. *Ecological Applications*, 15, 2084-2096.
- Bazzaz, F.A., Jasienski, M., Thomas, S.C. & Wayne, P. (1995) Microevolutionary responses in experimental populations of plants to CO₂-enriched environments: Parallel results from two model systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 8161-8165.
- Beattie, G.A. & Lindow, S.E. (1999) Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. *Phytopathology*, 89, 353-359.
- Becker, J., Eisenhauer, N., Scheu, S. & Jousset, A. (2012) Increasing antagonistic interactions cause bacterial communities to collapse at high diversity. *Ecology Letters*, 15, 468-474.
- Bender, C., Alarcon-Chaidez, F. & Gross, D. (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 266-292.

- Bernard, L., Mougél, C., Maron, P.A., Nowak, V., Lévêque, J., Henault, C., Haichar, F.Z., et al. (2007) Dynamics and identification of soil microbial populations actively assimilating carbon from ^{13}C -labelled wheat residue as estimated by DNA- and RNA-SIP techniques. *Environmental Microbiology*, 9, 752-764.
- Bertrand, C. (2004) Les derniers 1000 ans. *Comptes Rendus Geoscience*, 336, 741-750.
- Bessler, H., Oelmann, Y., Roscher, C., Buchmann, N., Scherer-Lorenzen, M., Schulze, E.D., Temperton, V.M., et al. (2012) Nitrogen uptake by grassland communities: contribution of N_2 fixation, facilitation, complementarity, and species dominance. *Plant and Soil*, 358, 301-322.
- Bever, J.D., Westover, K.M. & Antonovics, J. (1997) Incorporating the soil community into plant population dynamics: the utility of the feedback approach. *Journal of Ecology*, 85, 561-573.
- Bever, J.D., Richardson, S.C., Lawrence, B.M., Holmes, J. & Watson, M. (2009) Preferential allocation to beneficial symbiont with spatial structure maintains mycorrhizal mutualism. *Ecology Letters*, 12, 13-21.
- Bever, J.D., Platt, T.G. & Morton, E.R. (2012) Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual Review of Microbiology*, 66, 265-283.
- Bezemer, T.M., Fountain, M.T., Barea, J.M., Christensen, S., Dekker, S.C., Duyts, H., van Hal, R., et al. (2010) Divergent composition but similar function of soil food webs of individual plants: plant species and community effects. *Ecology*, 91, 3027-3036.
- Bianciotto, V. & Bonfante, P. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialised niche for rhizospheric and endocellular bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 365-371.
- Blondon, F., Marie, D., Brown, D. & Kondorosi, A. (1994) Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37, 264-270.
- Boivin, C., Camut, S., Malpica, C.A., Truchet, G. & Rosenberg, C. (1990). *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *The Plant Cell*, 2, 1157-1170.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijnjes, A.H.M., Lamers, G.E.M., Chin-A-Woeng, T.F.C., Lugtenberg, B.J.J. & Bloemberg, G.V. (2003) Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 983-993.
- Bonfante, P. & Anca, I.A. (2009) Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Review of Microbiology*, 63, 363-383.
- Borer, E.T., Seabloom, E.W. & Tilman, D. (2012) Plant diversity controls arthropod biomass and temporal stability. *Ecology Letters*, 15, 1457-1464.

- Boutton, T.W. (1991) Stable carbon isotope ratios of natural materials. I. Sample preparation and mass spectrometric analysis. In: Carbon isotope techniques. (Ed. By Coleman, D.C. & Fry, B.). Academic Press, New York.
- Boutton, T.W. (1996) Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: Mass Spectrometry of Soils. (Ed. By Boutton, T.W. & Yamasaki, S.I.). Marcel Dekker, New York.
- Brencic, A. & Winans, S.C. (2005) Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69, 155-194.
- Briat, J.F. (2007) Iron Dynamics in Plants. *Advances in Botanical Research*, 46, 137-180.
- Brooks, P.D., Williams, M.W. & Schmidt, S.K. (1998) Inorganic nitrogen and microbial biomass dynamics before and during spring snowmelt. *Biogeochemistry*, 43, 1-15.
- Brundrett, M.C. (2002) Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*, 154, 275-304.
- Brussaard, L., De Ruiter, P.C., & Brown, G.G. (2007) Soil biodiversity for agricultural sustainability. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 121, 233-244.
- Bunce, J.A. (2008) Contrasting responses of seed yield to elevated carbon dioxide under field conditions within *Phaseolus vulgaris*. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 128, 219-224.
- Burdon, J.J., Thrall, P.H. & Ericson, L. (2006) The current and future dynamics of disease in plant communities. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 19-39.
- Butler, J.L., Williams, M.A., Bottomley, P.J. & Myrold, D.D. (2003) Microbial community dynamics associated with rhizosphere carbon flow. *Applied in Environmental Microbiology*, 69, 6793-6800.

- C -

- Cadisch, G., Espana, M., Causey, R., Richter, M., Shaw, E., Morgan, J.A.W., Rahn, C., et al. (2005) Technical considerations for the use of ¹⁵N-DNA stable-isotope probing for functional microbial activity in soils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 1424-1428.
- Callahan, H.S., Maughan, H. & Steiner, U.K. (2008) Phenotypic plasticity, costs of phenotypes, and costs of plasticity: toward an integrative view. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1133, 44-66.
- van Capelle, C., Schrader, S. & Brunotte, J. (2012) Tillage-induced changes in the functional diversity of soil biota – A review with a focus on German data. *European Journal of Soil Biology*, 50, 165-181.

- Cardinale, B.J., Ives, A.R. & Inchausti, P. (2004) Effects of species diversity on the primary productivity of ecosystems: extending our spatial and temporal scales of inference. *Oikos*, 104, 437-450.
- Carney, K.M., Hungate, B.A., Drake, B.G. & Megonigal, J.P. (2007) Altered soil microbial community at elevated CO₂ leads to loss of soil carbon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 4990-4995.
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Corell, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N. & Smith, V.H. (1998) Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*, 8, 559-568.
- Cash, S.D. & Ditterline, R.L. (1996) Seed size effects on growth and N₂ fixation of juvenile sainfoin. *Field Crops Research*, 46, 145-151.
- Cassman, K.G. (1999) Ecological intensification of cereal production systems: yield potential, soil quality, and precision agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 5952-5959.
- Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Varma Penmetsa, R., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., et al. (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *The Plant Cell*, 12, 1647-1665.
- Chabaud, M., Lichtenzweig, J., Ellwood, S., Pfaff, T. & Journet, P. (2006) Vernalization , crossings and testing for pollen viability. *Medicago truncatula Handbook*, 1-13.
- Chapin III, F.S. (1990) The Ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 21, 423-447.
- Chapin III, F.S., Shaver, G.R., Giblin, A.E., Nadelhoffer, K.J. & Laundre, J.A. (1995) Responses of Arctic Tundra to experimental and observed changes in climate. *Ecology*, 76, 694-711.
- Chapin III, F.S., Walker, B.H., Hobbs, R.J., Hooper, D.U., Lawton, J.H., Sala, O.E. & Tilman, D. (1997) Biotic Control over the Functioning of Ecosystems. *Science*, 277, 500-504.
- Chapin III, F.S., Zavaleta, E.S., Eviner, V.T., Naylor, R.L., Vitousek, P.M., Reynolds, H.L., Hooper, D.U., et al. (2000) Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 405, 234-242.
- Chapin III, F.S., Randerson, J.T., McGuire, A.D., Foley, J.A. & Field, C.B. (2008) Changing feedbacks in the climate-biosphere system. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6, 313-320.
- Chavan, A. & Mukherji, S. (2008) Treatment of hydrocarbon-rich wastewater using oil degrading bacteria and phototrophic microorganisms in rotating biological contactor: effect of N:P ratio. *Journal of Hazardous Materials*, 154, 63-72.
- Cleland, E.E., Chiariello, N.R., Loarie, S.R., Mooney, H.A. & Field, C.B. (2006) Diverse responses of phenology to global changes in a grassland ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 13740-13744.

- Colebatch, G., Trevaskis, B. & Udvardi, M. (2002) Symbiotic nitrogen fixation research in the postgenomics area. *New Phytologist*, 153, 37-42.
- Cook, D.R. (1999) *Medicago truncatula* – a model in the making! *Current Opinion in Plant Biology*, 2, 301-304.
- Cooper, C.S., Ditterline, R.L. & Welty, L.E. (1979) Seed size and seeding rate effects upon stand density and yield of alfalfa. *Agronomy Journal*, 71, 83-85.
- Cortois, R. & De Deyn, G.B. (2012) The curse of the black box. *Plant and Soil*, 350, 27-33.
- Crispo, E., Dibattista, J.D., Correa, C., Thibert-planté, X., Mckellar, A.E., Schwartz, A.K., Berner, D., et al. (2010) The evolution of phenotypic plasticity in response to anthropogenic disturbance. *Evolutionary Ecology Research*, 12, 47-66.
- Csima, G., Hernádi, I. & Posta, K. (2012) Effects of pre- and post-transplant inoculation with commercial arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on pelargonium (*Pelargonium hortorum*) and its microorganism community. *Agricultural and Food Science*, 21, 52-61.
- Curtis, T.P., Sloam, W.T. & Scannell, J.W. (2002) Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 10494-10499.

- D -

- DaMatta, F.M., Grandis, A., Arenque, B.C. & Buckeridge, M.S. (2010) Impacts of climate change on crop physiology and food quality. *Food Research International*, 43, 1814-1823.
- Davidson, A.M., Jennions, M. & Nicotra, A.B. (2011) Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive ? A meta-analysis. *Ecology Letters*, 14, 419-431.
- Decaëns, T. (2010) Macroecological patterns in soil communities. *Global Ecology and Biogeography*, 19, 287-302.
- De Deyn, G.B., Raaijmakers, C.E. & van der Putten, W. (2004) Plant community development is affected by nutrients and soil biota. *Journal of Ecology*, 92, 824-834.
- Delmont, T.O., Robe, P., Cecillon, S., Clark, I.M., Constancias, F., Simonet, P., Hirsch, P. R., et al. (2011) Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1315-1324.
- Denef, K., Bubenheim, H., Lenhart, K., Vermeulen, J., van Cleemput, O., Boeckx, P. & Muller, C. (2007) Community shifts and carbon translocation within metabolically-active rhizosphere microorganisms in grasslands under elevated CO₂. *Biogeosciences*, 4, 769-779.
- Denison, R.F. & Kiers, E.T. (2004a) Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 237, 187-193.

- Denison, R.F. & Kiers, E.T. (2004b) Why are most rhizobia beneficial to their plant hosts, rather than parasitic ? *Microbes and Infection*, 6, 1235-1239.
- Dequiedt, S., Saby, N.P.A., Lelievre, M., Jolivet, C., Thioulouse, J., Toutain, B., Arrouays, D., et al. (2011) Biogeographical patterns of soil molecular microbial biomass as influenced by soil characteristics and management. *Global Ecology and Biogeography*, 20, 641-652.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., van de Broek, A. & Vanderleyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant and Soil*, 212, 155-164.
- Doornbos, R.F., Loon, L.C. & Bakker, P.A.H.M. (2012) Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32, 227-243.
- Douglas, A.E. (2008) Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist*, 177, 849-858.
- Drake, B.G., Gonzalez-Meler, M.A. & Long, S.P. (1997) More efficient plants: a consequence of rising atmospheric CO₂ ? *Annual Review of Plant physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 609-639.
- Drigo, B., Kowalchuk, G.A. & van Veen, J.A. (2008) Climate change goes underground: effects of elevated atmospheric CO₂ on microbial community structure and activities in the rhizosphere. *Biology and Fertility of Soils*, 44, 667-679.
- Drigo, B., Anderson, I.C., Kannangara, G.S.K., Cairney, J.W.G. & Johnson, D. (2012) Rapid incorporation of carbon from ectomycorrhizal mycelial necromass into soil fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 49, 4-10.
- Duffy, J.E. (2003) Biodiversity loss, trophic skew and ecosystem functioning. *Ecology Letters*, 6, 680-687.
- Dunford, E. A. & Neufeld, J. D. (2010) DNA stable-isotope probing (DNA-SIP). *Journal of Visualized Experiments*, 42, 1-6.
- Dunn, R.M., Mikola, J., Bol, R. & Bardgett, R.D. (2006) Influence of microbial activity on plant-microbial competition for organic and inorganic nitrogen. *Plant and Soil*, 289, 321-334.
- Duplessy, J-C. (2001) État des connaissances et incertitudes sur le changement climatique induit par les activités humaines. *Sciences de la Terre et des Planètes*, 333, 765-773.
- Dyer, L.A. & Letourneau, D. (2003) Top-down and bottom-up diversity cascades in detrital vs. living food webs. *Ecology Letters*, 6, 60-68.

- E -

- Eisenhauer, N., Cesarz, S., Koller, R., Worm, K. & Reich, P.B. (2012) Global change belowground: impacts of elevated CO₂, nitrogen, and summer drought on soil food webs and biodiversity. *Global Change Biology*, 18, 435-447.
- van Elsas, J.D., Chiurazzi, M., Mallon, C.A., Elhottova, D., Kristufek, V. & Salles, J.F. (2012) Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109, 1159-1164.
- Eparvier, A., Lemanceau, P. & Alabouvette, C. (1991) Population dynamics of non-pathogenic *Fusarium* and fluorescent *Pseudomonas* strains in rockwool, a substratum for soilless culture. *FEMS Microbiology Ecology*, 86, 177-184.

- F -

- Farrand, S.K., van Berkum, P. & Oger, P. (2003) *Agrobacterium* is a definable genus of the family Rhizobiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1681-1687.
- Fierer, N., Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Zaneveld, J., Bradford, M.A. & Knight, R. (2012) Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal*, 6, 1007-1017.
- Finlay, B.J., Maberly, S.C. & Cooper, J.I. (1997) Microbial Diversity and Ecosystem Function. *Oikos*, 80, 209-213.
- Finzi, A.C., Sinsabaugh, R.L., Long, T.M. & Osgood, M.P. (2006) Microbial community responses to atmospheric carbon dioxide enrichment in a warm-temperate forest. *Ecosystems*, 9, 215-226.
- Flynn, D.F.B., Gogol-Prokurat, M., Nogeire, T., Molinari, N., Richers, B.T., Lin, B.B., Simpson, N., et al. (2009) Loss of functional diversity under land use intensification across multiple taxa. *Ecology Letters*, 12, 22-33.
- Fransen, S.C. & Cooper, C.S. (1976) Seed weight effects upon emergence, leaf development, and growth of sainfoin (*Onobrychis*-spp) seedling. *Crop Science*, 16, 434-437.
- FRB, Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité. (2012) Les valeurs de la biodiversité: un état des lieux de la recherche française.
- Frey-Klett, P., Garbaye, J. & Tarkka, M. (2007) The mycorrhizal helper bacteria revisited. *New Phytologist*, 176, 22-36.
- Friedrich, M.W. (2006) Stable-isotope probing of DNA: insights into the function of uncultivated microorganisms from isotopically labeled metagenomes. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 59-66.

- G -

- Gamfeldt, L., Hillebrand, H. & Jonsson, P.R. (2008) Multiple functions increase the importance of biodiversity for overall ecosystem functioning. *Ecology*, 89, 1223-1231.
- Gans, J., Wolinsky, M. & Dunbar, J. (2005) Computational Improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, 309.
- Gera Hol, W.H., De Boer, W., Termorshuizen, A.J., Meyer, K.M., Schneider, J.H.M., van Dam, N.M., van Veen, J.A., et al. (2010) Reduction of rare soil microbes modifies plant-herbivore interactions. *Ecology Letters*, 13, 292-301.
- Ghalambor, C.K., McKAY, J.K., Carroll, S.P. & Reznick, D.N. (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, 21, 394-407.
- Ghannoum, O., Caemmerer, S. Von, Ziska, L.H. & Conroy, J.P. (2000) The growth response of C4 plants to rising atmospheric CO₂ partial pressure: a reassessment. *Plant, Cell and Environment*, 23, 931-942.
- Gill, R.A. & Jackson, R.B. (2000) Global patterns of root turnover for terrestrial ecosystems. *New Phytologist*, 147, 13-31.
- Girard, M.C., Walter, C., Rémy, J.C., Berthelin, J. & Morel, J.L. (2005) Sols et Environnement, Chapitre 14. Dunod.
- Goddard, M.R. & Bradford, M.A. (2003) The adaptive response of a natural microbial population to carbon- and nitrogen-limitation. *Ecology Letters*, 6, 594-598.
- Grace, J. & Zhang, R. (2006) Predicting the effect of climate change on global plant productivity and the carbon cycle. In: Plant growth and climate change (Ed. By Morison, J.I.L & Morecroft, M.D.). Blackwell Publishing, Oxford.
- Griffiths, B., Ritz, K., Bardgett, R., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S., et al. (2000) Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos*, 90, 279-294.
- Gutzeit, G., Lorch, D., Weber, A., Engels, M. & Neis, U. (2005) Biofloculent algal–bacterial biomass improves low-cost wastewater treatment. *Water Science and Technology*, 52, 9-18.

- H -

- Haddad, N.M., Crutsinger, G.M., Gross, K., Haarstad, J. & Tilman, D. (2011) Plant diversity and the stability of foodwebs. *Ecology Letters*, 14, 42-46.
- Haichar, F.E.Z., Marol, C., Berge, O., Rangel-Castro, J.I., Prosser, J.I., Balesdent, J., Heulin, T., et al. (2008) Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal*, 2, 1221-1230.
- Harker, K.N., Blackshaw, R.E. & Clayton, G.W. (2001) Timing Weed Removal in Field Pea (*Pisum sativum*). *Weed Technology*, 15, 277-283.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004) Trichoderma species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews, Microbiology*, 2, 43-56.
- Hartnett, D.C. & Wilson, W.T. (1999) Mycorrhizae influence plant community structure and diversity in tall grass prairie. *Ecology*, 80, 1187-1195.
- Hawkes, C.V., Wren, I.F., Herman, D.J. & Firestone, M.K. (2005) Plant invasion alters nitrogen cycling by modifying the soil nitrifying community. *Ecology Letters*, 8, 976-985.
- He, W.M. & Dong, M. (2003) Plasticity in physiology and growth of *Salix matsudana* in response to simulated atmospheric temperature rise in the Mu Us Sandland. *Photosynthetica*, 41, 297-300.
- He, Z., Piceno, Y., Deng, Y., Xu, M., Lu, Z., Desantis, T., Andersen, G., et al. (2012) The phylogenetic composition and structure of soil microbial communities shifts in response to elevated carbon dioxide. *The ISME Journal*, 6, 259-272.
- Heath, K.D. & Tiffin, P. (2007) Context dependence in the coevolution of plant and rhizobial mutualists. *The Royal Society*, 274, 1905-1912.
- Hegerl, G.C., Crowley, T.J., Baum, S.K., Kim, K-Y. & Hyde, W.T. (2003) Detection of volcanic, solar and greenhouse gas signals in paleo-reconstructions of Northern Hemispheric temperature. *Geophysical Research Letters*, 30.
- van der Heijden, M.G.A., Klironomos, J.N., Ursic, M., Moutoglis, P., Streitwolf-Engel, R., Boller, T., Wiemken, A., et al. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396.
- van der Heijden, M.G.A., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T.R., Rutten, M., van Logtestijn, R. & Staehelin, C. (2006a) Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 56, 178-187.
- van der Heijden, M.G.A., Streitwolf-Engel, R., Riedl, R., Siegrist, S., Neudecker, A., Ineichen, K., Boller, T., et al. (2006b) The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytologist*, 172, 554-562.

- van der Heijden, M.G.A., Bardgett, R.D. & van Straalen, N.M. (2008) The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 296-310.
- Heller, R., Esnault, R. & Lance, C. (1993) *Physiologie végétale. 1. Nutrition.* (5e Ed.). Masson, Paris.
- Hill, M.O. (1973) Diversity and Evenness: A unifying notation and its consequences. *Ecology*, 54, 427-432.
- Hobbie, J. & Hobbie, E. (2006) ¹⁵N in symbiotic fungi and plants estimates nitrogen and carbon flux rates in Arctic tundra. *Ecology*, 87, 816-822.
- Holland, J.N., DeAngelis, D.L. & Schultz, S.T. (2004) Evolutionary stability of mutualism: interspecific population regulation as an evolutionarily stable strategy. *The Royal Society*, 271, 1807-1814.
- Holt, R.D. (2003) On the evolutionary ecology of species' ranges. *Evolutionary Ecology Research*, 5, 159-178.
- Hong, J.J., Park, Y.S., Bravo, A., Bhattarai, K.K., Daniels, D.A. & Harrison, M.J. (2012) Diversity of morphology and function in arbuscular mycorrhizal symbioses in *Brachypodium distachyon*. *Planta*, 236, 851-865.
- Horner-Devine, M.C., Leibold, M.A., Smith, V.H. & Bohannan, B.J.M. (2003) Bacterial diversity patterns along a gradient of primary productivity. *Ecology Letters*, 6, 613-622.
- Houlden, A., Timms-Wilson, T.M., Day, M.J. & Bailey, M.J. (2008) Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 65, 193-201.
- Houlton, B.Z., Sigman, D.M. & Hedin, L.O. (2006) Isotopic evidence for large gaseous nitrogen losses from tropical rainforests. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 8745-8750.
- Hueck, C.J. (1998) Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 379-433.
- Hulme, P.E. (2008) Phenotypic plasticity and plant invasions: is it all Jack ? *Functional Ecology*, 22, 3-7.
- Hungate, B.A., Jaeger III, C.H., Gamara, G., Chapin III, F.S. & Field, C.B. (2000) Soil microbiota in two annual grasslands: responses to elevated atmospheric CO₂. *Oecologia*, 124, 589-598.
- Hungate, B.A., Stiling, P.D., Dijkstra, P., Johnson, D.W., Ketterer, M.E., Hymus, G.J., Hinkle, C.R., et al. (2004) CO₂ elicits long-term decline in nitrogen fixation. *Science*, 304.

Hussain, S., Siddique, T., Saleem, M., Arshad, M., & Khalid, A. (2009) Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes, and biochemical reactions. *Advances in Agronomy*, 102, 159-200.

Huxman, T.E., Hamerlynck, E.P. & Smith, S.D. (1999) Reproductive allocation and seed production in *Bromus madritensis* ssp. *rubens* at elevated atmospheric CO₂. *Functional Ecology*, 13, 769-777.

- I -

IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. (2001) Climate change: The Scientific Basis. Cambridge University Press, New York.

IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. (2007) The physical science basis: Summary for Policymakers. Cambridge University Press, New York.

- J -

Jarvis, P.G. & McNaughton, K.G. (1986) Stomatal control of transpiration: scaling up from leaf to region. In: *Advances in ecological research*, Volume 15. Academic Press, London.

Jia, Z. & Conrad, R. (2009) Bacteria rather than Archaea dominate microbial ammonia oxidation in an agricultural soil. *Environmental Microbiology*, 11, 1658-1671.

Johnson, N.C., Wolf, J. & Koch, G.W. (2003) Interactions among mycorrhizae, atmospheric CO₂ and soil N impact plant community composition. *Ecology Letters*, 6, 532-540.

Johnstone, R.A. & Bshary, R. (2008) Mutualism, market effects and partner control. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 879-888.

Jones, P.D., New, M., Parker, D.E., Martin, S. & Rigor, I.G. (1999) Surface air temperature and its changes over the past 150 years. *Reviews of Geophysics*, 37, 173-199.

- K -

Kahmen, A., Renker, C., Unsicker, S.B. & Buchmann, N. (2006) Niche complementarity for nitrogen: an explanation for the biodiversity and ecosystem functioning relationship? *Ecology*, 87, 1244-1255.

Keiblinger, K.M., Wilhartitz, I.C., Schneider, T., Roschitzki, B., Schmid, E., Eberl, L., Riedel, K., et al. (2012) Soil metaproteomics - Comparative evaluation of protein extraction protocols. *Soil Biology and Biochemistry*, 54, 14-24.

- Kemen, E. & Jones, J.D.G. (2012) Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles ? *Trends in Plant Science*, 17, 448-457.
- Kerstens, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. & Stackebrandt, E. (2006) Introduction to the Proteobacteria. In: *The Prokaryotes*, Third edition (Ed. By Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E.). Springer, New York.
- Khan, I.A., Ayub, N., Mirza, S.N., Nizami, S.M. & Azam, M. (2008) Synergistic effect of dual inoculation (vesicular-arbuscular mycorrhizae) on the growth and nutrients uptake of *Medicago Sativa*. *Pakistan Journal of Botany*, 40, 939-945.
- Kihara, J., Martius, C., Bationo, A., Thuita, M., Lesueur, D., Herrmann, L., Amelung, W., et al. (2012) Soil aggregation and total diversity of bacteria and fungi in various tillage systems of sub-humid and semi-arid Kenya. *Applied Soil Ecology*, 58, 12-20.
- King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocanin and fluorescin. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301-307.
- Kirschbaum, M.U. (2004) Soil respiration under prolonged soil warming: are rate reductions caused by acclimation or substrate loss ? *Global Change Biology*, 10, 1870-1877.
- Knelman, J.E., Legg, T.M., O'Neill, S.P., Washenberger, C.L., González, A., Cleveland, C. C. & Nemergut, D.R. (2012) Bacterial community structure and function change in association with colonizer plants during early primary succession in a glacier forefield. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 172-180.
- Koellner, T. & Scholz, R.W. (2008) Assessment of land use impacts on the natural environment. Part 2: Generic characterization factors for local species diversity in central Europe. *The International Journal of Life Cycle Assessment*, 13, 32-48.
- Kramer, K. (1995) Phenotypic plasticity of the phenology of seven European tree species in relation to climatic warming. *Plant, Cell and Environment*, 18, 93-104.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J.J. (2004) Rhizoremediation: A beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 6-15.
- Kuramae, E.E., Yergeau, E., Wong, L.C., Pijl, A.S., van Veen, J.A. & Kowalchuk, G.A. (2012) Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 12-24.
- Kuzyakov, Y. & Domanski, G. (2000) Carbon input by plants into the soil. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163, 421-431.
- Kuzyakov, Y., Hill, P.W. & Jones, D.L. (2007) Root exudate components change litter decomposition in a simulated rhizosphere depending on temperature. *Plant and Soil*, 290, 293-305.

- L -

- Lambers, H., Mougél, C., Jaillard, B. & Hinsinger, P. (2009) Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. *Plant and Soil*, 321, 83-115.
- Landa, B.B., Mavrodi, D.M., Thomashow, L.S. & Weller, D.M. (2003) Interactions between strains of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 93, 982-994.
- Leake, J., Johnson, D., Donnelly, D., Muckle, G., Boddy, L. & Read, D. (2004) Networks of power and influence: the role of mycorrhizal mycelium in controlling plant communities and agroecosystem functioning. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1016-1045.
- Lee, T.D., Tjoelker, M.G., Ellsworth, D.S. & Reich, P.B. (2001) Leaf gas exchange responses of 13 prairie grassland species to elevated CO₂ and increased nitrogen supply. *New Phytologist*, 150, 405-418.
- Lee, C.G., Watanabe, T., Sato, Y., Murase, J., Asakawa, S. & Kimura, M. (2011) Bacterial populations assimilating carbon from ¹³C-labeled plant residue in soil: Analysis by a DNA-SIP approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 814-822.
- Legendre, P. & Legendre, L. (1998) Numerical ecology. *Elsiever*, Amsterdam.
- Leigh, J., Fitter, A.H. & Hodge, A. (2011) Growth and symbiotic effectiveness of an arbuscular mycorrhizal fungus in organic matter in competition with soil bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 76, 428-438.
- Lemanceau, P., Samson, R. & Alabouvette, C. (1988). Recherches sur la résistance des sols aux maladies. XV. Comparaison des populations de *Pseudomonas fluorescens* dans un sol résistant et un sol sensible aux fusarioses vasculaires. *Agronomie*, 8, 243-249.
- Lemanceau, P. (1992) Effets bénéfiques de rhizobactéries sur les plantes : exemple des *Pseudomonas* spp fluorescents. *Agronomie*, 12, 413-437.
- Lepinay, C., Rigaud, T., Salon, C., Lemanceau, P. & Mougél, C. (2012) Interaction between *Medicago truncatula* and *Pseudomonas fluorescens*: Evaluation of costs and benefits across an elevated atmospheric CO₂. *Plos One*, 7, e45740.
- Lesaulnier, C., Papamichail, D., McCorkle, S., Ollivier, B., Skiena, S., Taghavi, S., Zak, D., et al. (2008) Elevated atmospheric CO₂ affects soil microbial diversity associated with trembling aspen. *Environmental Microbiology*, 10, 926-441.
- Liang, C., Jesus, E.D.C., Duncan, D.S., Jackson, R.D., Tiedje, J.M. & Balser, T.C. (2012) Soil microbial communities under model biofuel cropping systems in southern Wisconsin, USA: Impact of crop species and soil properties. *Applied Soil Ecology*, 54, 24-31.
- Liao, C., Peng, R., Luo, Y., Zhou, X., Wu, X., Fang, C., Chen, J., et al. (2008) Altered ecosystem carbon and nitrogen cycles by plant invasion: A meta-analysis. *New Phytologist*, 177, 706-714.

- Lilleskov, E.A., Fahey, T.J., Horton, T.R. & Lovett, G.M. (2002) Belowground ectomycorrhizal fungal community change over a nitrogen deposition gradient in Alaska. *Ecology*, 83, 104-115.
- Llorens, L., Peñuelas, J., Estiarte, M. & Bruna, P. (2004a) Contrasting growth changes in two dominant species of a Mediterranean shrubland submitted to experimental drought and warming. *Annals of Botany*, 94, 843-853.
- Llorens, L., Peñuelas, J., Beier, C., Emmett, B., Estiarte, M. & Tietema, A. (2004b) Effects of an experimental increase of temperature and drought on the photosynthetic performance of two ericaceous shrub species along a north-south European gradient. *Ecosystems*, 7, 613-624.
- Lloyd, A.H. & Fastie, C.L. (2002) Spatial and temporal variability in the growth and climate response of treeline trees in Alaska. *Climatic Change*, 52, 481-509.
- Logan, J.A., Régnière, J. & Powell, J.A. (2003) Assessing the impacts of global warming on forest pest dynamics. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1, 130-137.
- Loik, M.E., Redar, S.P. & Harte, J. (2000) Photosynthetic responses to a climate-warming manipulation for contrasting meadow species in the Rocky Mountains, Colorado, USA. *Functional Ecology*, 14, 166-175.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483.
- Loreau, M. (2000) Biodiversity and ecosystem functioning: recent theoretical advances. *Oikos*, 91, 3-17.
- Loreau, M. (2001a) Microbial diversity, producer-decomposer interactions and ecosystem processes: a theoretical model. *The Royal Society*, 268, 303-309.
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., Bengtsson, J., Grime, J. P., Hector, A., Hooper, D. U., et al. (2001b) Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges. *Science*, 294, 804-808.
- Loreau, M., Naeem, S. & Inchausti, P. (2002) Biodiversity and Ecosystem Functioning - Synthesis and Perspectives. (Ed. By Loreau, M., Naeem, S. & Inchausti, P.). University Press, Oxford.
- Lugtenberg, B.J.J., Chin-A-Woeng, T.F.C. & Bloemberg, G.V. (2002) Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 373-383.
- Luo, Y., Sims, D.A. & Griffin, K.L. (1998) Nonlinearity of photosynthetic responses to growth in rising atmospheric CO₂: an experimental and modelling study. *Global Change Biology*, 4, 173-183.
- Luo, Y., Su, B., Currie, W.S., Dukes, J.S., Finzi, A., Hartwig, U., Hungate, B., et al. (2004) Progressive nitrogen limitation of ecosystem responses to rising atmospheric carbon dioxide. *BioScience*, 54.

- Luo, Y., Hui, D. & Zhang, D. (2006) Elevated CO₂ stimulates net accumulations of carbon and nitrogen in land ecosystems: a meta-analysis. *Ecology*, 87, 53-63.
- Luo, Y. (2007) Terrestrial carbon-cycle feedback to climate warming. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 683-712.
- Lynch, J.M. (1983) Soil Biotechnology - Microbiological factors in crop productivity. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Lynch, J.M. & Whipps, J.M. (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129, 1-10.

- M -

- MacArthur, R.H. & Wilson, E.O. (1967) The theory of island biogeography. Princeton University Press, New Jersey, USA.
- Manefield, M., Whiteley, A.S. & Bailey, M.J. (2004) What can stable isotope probing do for bioremediation ? *International Biodeterioration and Biodegradation*, 54, 163-166.
- Mapelli, F., Marasco, R., Rizzi, A., Baldi, F., Ventura, S., Daffonchio, D. & Borin, S. (2011) Bacterial communities involved in soil formation and plant establishment triggered by pyrite bioweathering on arctic moraines. *Microbial Ecology*, 61, 438-447.
- Maron, P.A., Mougel, C. & Ranjard, L. (2011) Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. *Comptes Rendus Biologies*, 334, 403-411.
- Matesanz, S., Gianoli, E. & Valladares, F. (2010) Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1206, 35-55.
- MEA, Millennium Ecosystem Assessment. (2005a) Ecosystems and Human Well-being: Synthesis. Island Press, Washington, DC.
- MEA, Millennium Ecosystem Assessment. (2005b) Cultivated Systems. In: Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends. Island Press, Washington, DC.
- Menzel, A. (2000) Trends in phenological phases in Europe between 1951 and 1996. *International Journal of Biometeorology*, 44, 76-81.
- Menzel, A., Jakobi, G., Ahas, R., Scheifinger, H. & Estrella, N. (2003) Variations of the climatological growing season (1951-2000) in Germany compared to other countries. *International Journal of Climatology*, 23, 793-812.
- Menzel, A., Sparks, T.H., Estrella, N., Koch, E., Aasa, A., Ahas, R., Alm-Kübler, K., et al. (2006) European phenological response to climate change matches the warming pattern. *Global Change Biology*, 12, 1969-1976.

- Metcalf, C.J.E. & Mitchell-Olds, T. (2009) Life history in a model system: opening the black box with *Arabidopsis thaliana*. *Ecology Letters*, 12, 593-600.
- Moreau, D., Salon, C. & Munier-Jolain, N. (2007) A model-based framework for the phenotypic characterization of the flowering of *Medicago truncatula*. *Plant, Cell and Environment*, 30, 213-224.
- Morgan, J.A.W., Bending, G.D. & White, P.J. (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56, 1729-1739.
- Morison, J.I.L. & Lawlor, D.W. (1999) Interactions between increasing CO₂ concentration and temperature on plant growth. *Plant, Cell and Environment*, 22, 659-682.
- Mougel, C., Offre, P., Ranjard, L., Corberand, T., Gamalero, E., Robin, C. & Lemanceau, P. (2006) Dynamic of the genetic structure of bacterial and fungal communities at different developmental stages of *Medicago truncatula* Gaertn. cv. Jemalong line J5. *New Phytologist*, 170, 165-175.
- Mulder, C., Cohen, J.E., Setälä, H., Bloem, J. & Breure, A.M. (2005) Bacterial traits, organism mass, and numerical abundance in the detrital soil food web of Dutch agricultural grasslands. *Ecology Letters*, 8, 80-90.

- N -

- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G. & Renella, G. (2003) Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54, 655-670.
- Nelson, G.C. (2005a) Drivers of Change in Ecosystem Condition and Services. In: *Ecosystems and human well-being, Volume 1 : current state and trends*. Island Press. Chapter 7, 175-214.
- Nelson, G.C. (2005b) Drivers of Ecosystem Change: Summary Chapter. In: *Ecosystems and human well-being, Volume 1 : current state and trends*. Island Press. Chapter 3, 73-76.
- Neufeld, J.D., Dumont, M.G., Vohra, J. & Murrell, J.C. (2007a) Methodological considerations for the use of stable isotope probing in microbial ecology. *Microbial Ecology*, 53, 435-442.
- Neufeld, J.D., Wagner, M. & Murrell, J.C. (2007b) Who eats what, where and when ? Isotope labelling experiments are coming of age. *The ISME Journal*, 1, 103-110.
- Newton, A.C., Fitt, B.D.L., Atkins, S.D., Walters, D.R. & Daniell, T.J. (2010) Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. *Trends in Microbiology*, 18, 365-373.
- Nguyen, C. (2003) Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie*, 23, 375-396.

- Nicotra, A.B., Atkin, O.K., Bonser, S.P., Davidson, A.M., Finnegan, E.J., Mathesius, U., Poot, P., et al. (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in Plant Science*, 15, 684-692.
- Nielsen, U.N., Ayres, E., Wall, D.H. & Bardgett, R.D. (2011) Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity-function relationships. *European Journal of Soil Science*, 62, 105-116.
- Norby, R.J. & Jackson, R.B. (2000) Root dynamics and global change: seeking an ecosystem perspective. *New Phytologist*, 147, 3-12.
- Nunes, C., De Sousa Araújo, S., Da Silva, J.M., Fevereiro, M.P.S. & Da Silva, A.B. (2008) Physiological responses of the legume model *Medicago truncatula* cv. Jemalong to water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, 63, 289-296.

- O -

- Offre, P., Pivato, B., Siblot, S., Gamalero, E., Corberand, T., Lemanceau, P. & Mougel, C. (2007) Identification of bacterial groups preferentially associated with mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 913-921.
- Oldroyd, G.E.D., Murray, J.D., Poole, P.S. & Downie, J.A. (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, 45, 119-144.
- Olesniewicz, K.S. & Thomas, R.B. (1999) Effects of mycorrhizal colonization on biomass production and nitrogen fixation of black locust (*Robinia pseudoacacia*) seedlings grown under elevated atmospheric carbon dioxide. *New Phytologist*, 142, 133-140.
- Oren, R., Ellsworth, D.S., Johnsen, K.H., Phillips, N., Ewers, B.E., Maier, C., Schäfer, K.V.R., et al. (2001) Soil fertility limits carbon sequestration by forest ecosystems in a CO₂-enriched atmosphere. *Nature*, 411.

- P -

- Pagan, I., Alonso-Blanco, C. & Garcia-Arenal, F. (2008) Host responses in life-history traits and tolerance to virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *Plos Pathogens*, 4, e1000124.
- Parmesan, C. (2006) Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 637-669.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 42, 207-220.
- Peh, K.S.H. & Lewis, S.L. (2012) Conservation implications of recent advances in biodiversity-functioning research. *Biological Conservation*, 151, 26-31.

- Philippot, L., Hallin, S. & Schloter, M. (2007) Ecology of denitrifying prokaryotes in agricultural soil. *Advances in Agronomy*, 96, 249-305.
- Phillips, R.L., Zak, D.R., Holmes, W.E. & White, D.C. (2002) Microbial community composition and function beneath temperate trees exposed to elevated atmospheric carbon dioxide and ozone. *Oecologia*, 131, 236-244.
- Pivato, B., Gamalero, E., Lemanceau, P. & Berta, G. (2008) Colonization of adventitious roots of *Medicago truncatula* by *Pseudomonas fluorescens* C7R12 as affected by arbuscular mycorrhiza. *FEMS Microbiology Letters*, 289, 173-180.
- Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P. & Berta, G. (2009) Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19, 81-90.
- Plassart, P., Terrat, S., Griffiths, R., Thomson, B., Dequiedt, S., Lelievre, M., Regnier, T., et al. (2012) Evaluation of the ISO Standard 11063 DNA extraction procedure for assessing soil microbial abundance and community structure. *Plos One*, 7, e44279.
- Post, W.M. & Kwon, K.C. (2000) Soil carbon sequestration and land-use change: processes and potential. *Global Change Biology*, 6, 317-327.
- Postma-Blaauw, M.B., De Goede, R.G.M., Bloem, J., Faber, J.H. & Brussaard, L. (2012) Agricultural intensification and de-intensification differentially affect taxonomic diversity of predatory mites, earthworms, enchytraeids, nematodes and bacteria. *Applied Soil Ecology*, 57, 39-49.
- Prieto, P., Peñuelas, J., Ogaya, R. & Estiarte, M. (2008) Precipitation-dependent flowering of *Globularia alypum* and *Erica multiflora* in mediterranean shrubland under experimental drought and warming, and its inter-annual variability. *Annals of Botany*, 102, 275-285.
- Pritchard, S., Rogers, H., Prior, S. & Peterson, C. (1999) Elevated CO₂ and plant structure: a review. *Global Change Biology*, 5, 807-837.
- van der Putten, W.H. (2003) Plant defense belowground and spatiotemporal processes in natural vegetation. *Ecology*, 84, 2269-2280.
- van der Putten, W.H., De Ruiter, P.C., Martijn Bezemer, T., Harvey, J.A., Wassen, M. & Wolters, V. (2004) Trophic interactions in a changing world. *Basic and Applied Ecology*, 5, 487-494.
- van der Putten, W.H., Macel, M. & Visser, M.E. (2010) Predicting species distribution and abundance responses to climate change: why it is essential to include biotic interactions across trophic levels. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 2025-2034.

- R -

- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R. & Murrell, C. (2000) Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403, 646-649.
- Ranjard, L., Lejon, D.P.H., Mougel, C., Schehrer, L., Merdinoglu, D. & Chaussod, R. (2003) Sampling strategy in molecular microbial ecology: influence of soil sample size on DNA fingerprinting analysis of fungal and bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 5, 1111-1120.
- Raynaud, X., Lata, J.C. & Leadley, P.W. (2006) Soil microbial loop and nutrient uptake by plants: a test using a coupled C:N model of plant-microbial interactions. *Plant and Soil*, 287, 95-116.
- Reich, P.B., Hungate, B.A. & Luo, Y. (2006) Carbon-nitrogen interactions in terrestrial ecosystems in response to rising atmospheric carbon dioxide. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 611-36.
- Reznick, D., Bryant, M.J. & Bashey, F. (2002) r- and K-selection revisited: the role of population regulation in life-history evolution. *Ecology*, 83, 1509-1520.
- Rimer, R.L. & Evans, R.D. (2006) Invasion of downy brome (*Bromus tectorum* L.) causes rapid changes in the nitrogen cycle. *The American Midland Naturalist*, 156, 252,258.
- Rogers, H.H., Prior, S.A., Runion, G.B. & Mitchell, R.J. (1996) Root to shoot ratio of crops as influenced by CO₂. *Plant and Soil*, 187, 229-248.
- Rogers, A., Gibon, Y., Stitt, M., Morgan, P.B., Bernacchi, C.J., Ort, D.R. & Long, S.P. (2006) Increased C availability at elevated carbon dioxide concentration improves N assimilation in a legume. *Plant, Cell and Environment*, 29, 1651-1658.
- Rosswall, T. (1976) The internal nitrogen cycle between microorganisms, vegetation and soil. *Ecological Bulletins*, 22, 157-167.
- Rudgers, J.A., Koslow, J.M. & Clay, K. (2004) Endophytic fungi alter relationships between diversity and ecosystem properties. *Ecology Letters*, 7, 42-51.
- Rudgers, J.A. & Clay, K. (2008) An invasive plant-fungal mutualism reduces arthropod diversity. *Ecology Letters*, 11, 831-840.
- Rustad, L.E., Campbell, J.L., Marion, G.M., Norby, R.J., Mitchell, M.J., Hartley, A.E., Cornelissen, J.H.C., et al. (2001) A meta-analysis of the response of soil respiration, net nitrogen mineralization, and aboveground plant growth to experimental ecosystem warming. *Oecologia*, 126, 543-562.
- Ryabov, A.B. & Blasius, B. (2011) A graphical theory of competition on spatial resource gradients. *Ecology Letters*, 14, 220-228.

- S -

- Sagan, M., Morandib, D., Tarenghib, E. & Due, G. (1995) Selection of nodulation and mycorrhizal mutants in the model plant *Medicago truncatula* (Gaertn.) after y-ray mutagenesis. *Plant Science*, 111, 63-71.
- Saikkonen, K., Wäli, P., Helander, M. & Faeth, S.H. (2004) Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science*, 9, 275-280.
- Salon, C., Munier-Jolain, N.G., Duc, G., Voisin, A.S., Grandgirard, D., Larmure, A., Emery, R.J.N., et al. (2001) Grain legume seed filling in relation to nitrogen acquisition: A review and prospects with particular reference to pea. *Agronomie*, 21, 539-552.
- Sanchez, L., Weidmann, S., Brechenmacher, L., Batoux, M., van Tuinen, D., Lemanceau, P., Gianinazzi, S., et al. (2004) Common gene expression in *Medicago truncatula* roots in response to *Pseudomonas fluorescens* colonization, mycorrhiza development and nodulation. *New Phytologist*, 161, 855-863.
- Sanchez, L., Weidmann, S., Arnould, C., Bernard, A.R., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (2005) *Pseudomonas fluorescens* and *Glomus mosseae* trigger DMI3-dependent activation of genes related to a signal transduction pathway in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 139, 1065-1077.
- Sanhewe, A.J., Ellis, R.H., Hong, T.D., Wheeler, T.R., Batts, G.R., Hadley, P. & Morison, J.I.L. (1996) The effect of temperature and CO₂ on seed quality development in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany*, 298, 631-637.
- Sardans, J., Rivas-Ubach, A. & Peñuelas, J. (2012) The C:N:P stoichiometry of organisms and ecosystems in a changing world: A review and perspectives. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 14, 33-47.
- Scheublin, T.R., van Logtestijn, R.S.P. & van Der Heijden, M.G.A. (2007) Presence and identity of arbuscular mycorrhizal fungi influence competitive interactions between plant species. *Journal of Ecology*, 95, 631-638.
- Schlichting, C. (2002) Phenotypic plasticity in plants. *Plant Species Biology*, 17, 85-88.
- Schmeisser, C., Steele, H. & Streit, W.R. (2007) Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75, 955-962.
- Schmera, D., Baur, B. & Erős, T. (2012) Does functional redundancy of communities provide insurance against human disturbances ? An analysis using regional-scale stream invertebrate data. *Hydrobiologia*, 693, 183-194.
- Schulz, S., Giebler, J., Chatzinotas, A., Wick, L.Y., Fetzer, I., Welzl, G., Harms, H., et al. (2012) Plant litter and soil type drive abundance, activity and community structure of alkB harbouring microbes in different soil compartments. *The ISME Journal*, 6, 1763-1774.

- Schutter, M.E., Sandeno, J.M. & Dick, R.P. (2001) Seasonal, soil type, and alternative management influences on microbial communities of vegetable cropping systems. *Biology and Fertility of Soils*, 34, 397-410.
- Sherry, R.A., Zhou, X., Gu, S., Arnone III, J.A., Schimel, D.S., Verburg, P.S., Wallace, L.L., et al. (2007) Divergence of reproductive phenology under climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 198-202.
- Simard, S.W., Beiler, K.J., Bingham, M.A., Deslippe, J.R., Philip, L.J. & Teste, F.P. (2012) Mycorrhizal networks: Mechanisms, ecology and modelling. *Fungal Biology Reviews*, 26, 39-60.
- Simon, C. & Daniel, R. (2011) Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 1153-1161.
- Six, J., Frey, S.D., Thiet, R.K. & Batten, K.M. (2006) Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Science Society of America Journal*, 70, 555-569.
- Smith, S.E. & Smith, F.A. (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 227-250.
- Snell-Rood, E.C., van Dyken, J.D., Cruickshank, T., Wade, M.J. & Moczek, A.P. (2010) Toward a population genetic framework of developmental evolution: the costs, limits, and consequences of phenotypic plasticity. *BioEssays*, 32, 71-81.
- Springer, C.J. & Ward, J.K. (2007) Flowering time and elevated atmospheric CO₂. *New Phytologist*, 176, 243-255.
- Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J. & May, G.D. (2006) Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 110-121.
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24, 487-506.
- Stegen, J.C., Enquist, B.J. & Ferrière, R. (2012) Eco-Evolutionary Community Dynamics: Covariation between Diversity and Invasibility across Temperature Gradients. *The American Naturalist*, 180, 110-126
- Stirling, G. & Wilsey, B. (2001) Empirical relationships between species richness, evenness, and proportional diversity. *The American Naturalist*, 158, 286-299.
- Stowe, K.A., Marquis, R.J., Hochwender, C.G. & Simms, E.L. (2000) The evolutionary ecology of tolerance to consumer damage. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 31, 565-595.
- Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K. & Naidu, R. (2011) Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential. *Biotechnology Advances*, 29, 896-907.

Supit, I., van Diepen, C.A., De Wit, A.J.W., Wolf, J., Kabat, P., Baruth, B. & Ludwig, F. (2012) Assessing climate change effects on European crop yields using the Crop Growth Monitoring System and a weather generator. *Agricultural and Forest Meteorology*, 164, 96-111.

- T -

Taiz, L. & Zeiger, E. (2010) Chapter 12: Assimilation of mineral nutrients. In: *Plant Physiology*, Fifth Edition. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, UK.

Tarnawski, S., Hamelin, J., Jossi, M., Aragno, M. & Fromin, N. (2006) Phenotypic structure of *Pseudomonas* populations is altered under elevated pCO₂ in the rhizosphere of perennial grasses. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 1193-1201.

Temperton, V.M., Grayston, S.J., Jackson, G., Barton, C.V.M., Millard, P. & Jarvis, P.G. (2003) Effects of elevated carbon dioxide concentration on growth and nitrogen fixation in *Alnus glutinosa* in a long-term field experiment. *Tree Physiology*, 23, 1051-1059.

Terrat, S., Christen, R., Dequiedt, S., Lelievre, M., Nowak, V., Regnier, T., Bachar, D., et al. (2011) Molecular biomass and metatranscriptomic assessment of soil microbial communities as influenced by soil DNA extraction procedure. *Microbial Biotechnology*, 1-7.

Thibert-Plante, X. & Hendry, A.P. (2011) The consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, 24, 326-342.

Thioulouse, J., Chessel, D., Dolédec, S. & Olivier, J.M. (1997) Ade-4: a multivariate analysis and graphical display software. *Statistical Computing*, 7, 75-83.

Thompson, J.N. (2001) Coevolution. *Nature*, 1-5.

Thompson, J.N. & Cunningham, B.M. (2002) Geographic structure and dynamics of coevolutionary selection. *Nature*, 417, 735-738.

Thoquet, P., Gherardi, M., Journet, E.P., Kereszt, A., Ané, J.M., Prosperi, J.M. & Huguet, T. (2002) The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes. *BMC plant biology*, 2, 1-13.

Thrall, P.H., Hochberg, M.E., Burdon, J.J. & Bever, J.D. (2007) Coevolution of symbiotic mutualists and parasites in a community context. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 120-126.

Tilman, D., Fargione, J., Wolff, B., D'Antonio, C., Dobson, A., Howarth, R., Schindler, D., et al. (2001a) Forecasting agriculturally driven global environmental change. *Science*, 292.

- Tilman, D., Reich, P.B., Knops, J., Wedin, D., Mielke, T. & Lehman, C. (2001b) Diversity and productivity in a long-term grassland experiment. *Science*, 294.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. & Polasky, S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418.
- Treseder, K.K. (2004) A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. *New Phytologist*, 164, 347-355.
- Trouvelot, A., Kough, J.L. & Gianinazzi-Pearson, V. (1986) Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In : Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhizae (Ed. By Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S.), pp. 217-221. INRA Presse, Paris, France.
- Tylianakis, J.M., Didham, R.K., Bascompte, J. & Wardle, D.A. (2008) Global change and species interactions in terrestrial ecosystems. *Ecology Letters*, 11, 1351-1363.

- U -

- Uhlik, O., Jecná, K., Leigh, M.B., Macková, M. & Macek, T. (2009) DNA-based stable isotope probing: a link between community structure and function. *Science of the Total Environment*, 407, 3611-3619.

- V -

- Vainio, E.J. & Hantula, J. (2000) Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research*, 104, 927-936.
- Valladares, F., Gianoli, E. & Gómez, J.M. (2007) Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, 176, 749-763.
- Vance, C.P. & Heichel G.H. (1991) Carbon in N₂ fixation: limitation or exquisite adaptation. *Annual Review of Plant Physiology*, 42, 373-392.
- Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J.F., Curie, C. & Lemanceau, P. (2007) Iron acquisition from Fe-Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20, 441-447.
- Verbruggen, E., van der Heijden, M.G.A., Rillig, M.C. & Kiers, E.T. (2012) Mycorrhizal fungal establishment in agricultural soils: factors determining inoculation success. *New Phytologist*, 1-6.

- Veresoglou, S.D., Mamolos, A.P., Thornton, B., Voulgari, O.K., Sen, R. & Veresoglou, D.S. (2011) Medium-term fertilization of grassland plant communities masks plant species-linked effects on soil microbial community structure. *Plant and Soil*, 344, 187-196.
- Veresoglou, S.D., Chen, B. & Rillig, M.C. (2012) Arbuscular mycorrhiza and soil nitrogen cycling. *Soil Biology and Biochemistry*, 46, 53-62.
- Vincent, J.M. (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Visscher, H., Sephton, M.A. & Looy, C.V. (2011) Fungal virulence at the time of the end-Permian biosphere crisis ? *Geology*, 39, 883-886.
- Vitousek, P.M. (1994) Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology*, 75, 1861-1876.
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J. & Melillo, J. (1997a) Human domination of Earth's ecosystems. *Science*, 277.
- Vitousek, P., Aber, J., Howarth, D.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, R., Schlesinger, W.H., et al. (1997b) Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7, 737-750.
- Vogelsang, K.M., Reynolds, H.L. & Bever, J.D. (2006) Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New Phytologist*, 172, 554-562.
- Voisin, A.S., Salon, C., Jeudy, C. & Warembourg, F.R. (2003) Seasonal patterns of ^{13}C partitioning between shoots and nodulated roots of N_2 - or nitrate-fed *Pisum sativum* L. *Annals of Botany*, 91, 539-546.
- Vriezen, J.A.C., De Bruijn, F.J. & Nüsslein, K. (2007) Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3451-3459.

- W -

- Wackett, L.P. (2004) Stable isotope probing in biodegradation research. *Trends in Biotechnology*, 22, 153-154.
- Wagner, J., Luscher, A., Hillebrand, C., Kobald, B., Spitaler, N. & Larcher, W. (2001) Sexual reproduction of *Lolium perenne* L. and *Trifolium repens* L. under free air CO_2 enrichment (FACE) at two levels of nitrogen application. *Plant, Cell and Environment*, 24, 957-965.
- Walther, G.R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T.J.C., Fromentin, J-M., et al. (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416.

- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Klironomos, J.N., Setälä, H., van der Putten, W.H. & Wall, D.H. (2004) Ecological linkages between aboveground and belowground biota. *Science*, 304.
- Wardle, D.A., Bardgett, R.D., Callaway, R.M. & van der Putten, W.H. (2011) Terrestrial ecosystem responses to species gains and losses. *Science*, 332, 1273-1277.
- Weigel, H.J. & Manderscheid, R. (2012) Crop growth responses to free air CO₂ enrichment and nitrogen fertilization: Rotating barley, ryegrass, sugar beet and wheat. *European Journal of Agronomy*, 43, 97-107.
- Werth, M. & Kuzyakov, Y. (2010) ¹³C fractionation at the root–microorganisms–soil interface: A review and outlook for partitioning studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 42, 1372-1384.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Freitag, T., Guillaumaud, N., et al. (2006) Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology*, 8, 2162-2169.
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Guillaumaud, N. & Le Roux, X. (2007) Decline of soil microbial diversity does not influence the resistance and resilience of key soil microbial functional groups following a model disturbance. *Environmental Microbiology*, 9, 2211-2219.
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52, 487-511.
- Whipps, J.M. (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1198-1227.
- Whitton, B.A. & Potts, M. (2012) Introduction to the Cyanobacteria. In: Ecology of Cyanobacteria II. Springer, Netherlands.
- Williams, M.A., Rice, C.W. & Owensby, C.E. (2000) Carbon dynamics and microbial activity in tallgrass prairie exposed to elevated CO₂ for 8 years. *Plant and Soil*, 227, 127-137.
- Wilson, M. & Lindow, S.E. (1993) Effect of phenotypic plasticity on epiphytic survival and colonization by *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 410-416.
- Wilson, G.W. & Hartnett, D.C. (1998) Interspecific variation in plant responses to mycorrhizal colonization in tallgrass prairie. *American Journal of Botany*, 85, 1732-1738.
- Woodward, F.I. (2002) Potential impacts of global elevated CO₂ concentrations on plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 207-211.
- Woodward, F.I. (2008) Plant waterworld. *New Phytologist*, 180, 557-559.
- Worm, B., Lotze, H.K., Hillebrand, H. & Sommer, U. (2002) Consumer versus resource control of species diversity and ecosystem functioning. *Nature*, 417, 848-851.

- Wu, C.H., Bernard, S.M., Andersen, G.L. & Chen, W. (2009) Developing microbe-plant interactions for applications in plant-growth promotion and disease control, production of useful compounds, remediation and carbon sequestration. *Microbial Biotechnology*, 2, 428-440.
- Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J. & van der Lelie, D. (2011) Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 299-323.

- Y -

- Yacobucci, B.D. & Schnepf, R. (2007) Ethanol and Biofuels: Agriculture, Infrastructure, and Market Constraints Related to Expanded Production. *Congressional Research Service Report for Congress*.
- Young, N.D., Mudge, J. & Ellis, T.N. (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 199-204.
- Yu, L., Nicolaisen, M., Larsen, J. & Ravnkov, S. (2012) Succession of root-associated fungi in *Pisum sativum* during a plant growth cycle as examined by 454 pyrosequencing. *Plant and Soil*, 358, 225-233.
- Yuan, H., Ge, T., Chen, C., O'Donnell, A.G. & Wu, J. (2012) Significant role for microbial autotrophy in the sequestration of soil carbon. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2328-2336.

- Z -

- Zak, D.R., Pregitzer, K.S., King, J.S. & Holmes, W.E. (2000) Elevated atmospheric CO₂, fine roots and the response of soil microorganisms: a review and hypothesis. *New Phytologist*, 147, 201-222.
- Zak, D.R., Holmes, W.E., White, D.C., Peacock, A.D. & Tilman, D. (2003) Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links ? *Ecology*, 84, 2042-2050.
- Zancarini, A., Mougel, C., Terrat, S., Salon, C. & Munier-Jolain, N. (2012) Combining ecophysiological and microbial ecological approaches to study the relationship between *Medicago truncatula* genotypes and their associated rhizosphere bacterial communities. *Plant and Soil*.

- Zancarini, A., Lepinay, C., Burstin, J., Duc, G., Lemanceau, P., Moreau, D., Munier-Jolain, N., et al. (2013) Combining molecular microbial ecology with ecophysiology and plant genetics for a better understanding of plant-microbial communities interactions in the rhizosphere. In: *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* (Ed. By de Bruijn, F.J.). Wiley-Blackwell, *In press* 2013.
- Zhou, X., Liu, X., Wallace, L.L. & Luo, Y. (2007) Photosynthetic and respiratory acclimation to experimental warming for four species in a Tallgrass Prairie Ecosystem. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 270-281.
- Zhu, H., Choi, H.K., Cook, D.R. & Shoemaker, R.C. (2005) Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology*, 137, 1189-1196.
- Ziska, L.H. & Bunce, J.A. (1997) Influence of increasing carbon dioxide concentration on the photosynthetic and growth stimulation of selected C4 crops and weeds. *Photosynthesis Research*, 54, 199-208.
- Ziska, L.H. (1998) The influence of root zone temperature on photosynthetic acclimation to elevated carbon dioxide concentrations. *Annals of Botany*, 81, 717-721.
- Ziska, L.H. & Bunce, J.A. (1998) The influence of increasing growth temperature and CO₂ concentration on the ratio of respiration to photosynthesis in soybean seedlings. *Global Change Biology*, 4, 637-643.
- Ziska, L.H. & Bunce, J.A. (2006) Plant responses to rising atmospheric carbon dioxide. In: *Plant growth and climate change* (Ed. By Morison, J.I.L. & Morecroft, M.D.). Blackwell Publishing, Oxford.
- Zvereva, E.L. & Kozlov, M.V. (2006) Consequences of simultaneous elevation of carbon dioxide and temperature for plant-herbivore interactions: a metaanalysis. *Global Change Biology*, 12, 27-41.

LISTE DES TABLEAUX

Table 1.1 Results of the ANOVA with repeated measures explaining the number of leaves of <i>Medicago truncatula</i>	101
Table 1.2 Linear models explaining the vegetative traits of <i>Medicago truncatula</i>	103
Table 1.3 Linear models explaining the reproductive traits of <i>Medicago truncatula</i>	107
Table 1.4 Linear models explaining the quantitative and qualitative aspects of seeds of <i>Medicago truncatula</i>	109
Table 1.5 ANOVA explaining the density of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 in the rhizosphere soil and the plant roots.	111
Table 2.1 Bacterial and fungal densities after 44 days of incubation in diluted soils.....	144
Table 2.2 Soil chemical characteristics in diluted soils after 44 days of incubation.....	145
Table 2.3 Number of reads, OTUs and diversity indices of the three diversity dilutions for bacterial and fungal community	145
Table 2.4 Measure of symbiotic associations for <i>M. truncatula</i> and <i>B. distachyon</i> with or without symbionts addition.....	147
Table 2.5 Effects of diversity level, symbionts addition and their interaction on growth and fitness of <i>M. truncatula</i> , <i>B. distachyon</i> and <i>A. thaliana</i>	148

LISTE DES FIGURES

Figure 0.1 Représentation schématique des trois zones de la rhizosphère.	18
Figure 0.2 Vision coûts-bénéfices de l'interaction plantes-microorganismes mutualistes.	20
Figure 0.3 Les différentes étapes de l'initiation et du développement d'un nodule racinaire de légumineuse.	25
Figure 0.4 Représentation schématique des interactions mutualistes entre la plante et les microorganismes et entre les microorganismes eux-mêmes au sein de la rhizosphère.	30
Figure 0.5 La redondance fonctionnelle microbienne.	34
Figure 0.6 Services écosystémiques rendus par les plantes, les microorganismes telluriques et leurs interactions.	39
Figure 0.7 Effets à court terme, les plus fréquents, des changements globaux affectant la plante et les microorganismes rhizosphériques avec lesquels elle interagit.	56
Figure 0.8 Présentation schématique des études courantes réalisées au niveau des interactions plantes-microorganismes et du nouvel angle d'étude de ces interactions constituant ce travail de thèse.	87
Figure 1.1 Average number of leaves of <i>Medicago truncatula</i> over its growth.	102
Figure 1.2 Average C/N ratio for shoot and root of <i>Medicago truncatula</i>	104
Figure 1.3 Average percentage of Nitrogen in <i>Medicago truncatula</i> shoot and root.	105
Figure 1.4 Average number of seeds per plant.	108
Figure 1.5 Carbon-Nitrogen ratio of <i>Medicago truncatula</i> seeds.	110
Figure 1.6 Average density of <i>Pseudomonas fluorescens</i> C7R12 over time..	112
Figure 1.S1 Description and illustration of a gnotobiotic pot.	121
Figure 1.7 Bilan des conséquences d'une hausse de la concentration en CO ₂ atmosphérique à 750 ppm sur l'interaction <i>Medicago truncatula</i> - <i>Pseudomonas fluorescens</i>	122
Figure 2.1 The effects of species richness loss on functions ensured by microbes for plant growth and fitness, in hypothetical community.	134
Figure 2.2 Root fresh biomass of <i>M. truncatula</i> and <i>B. distachyon</i>	149
Figure 2.S1 Fungal density in soil during incubation period for the three diversity dilution.	164

Figure 2.S2 Bacterial density in soil during incubation period for the three diversity dilution	164
Figure 2.S3 Difference between the three dilutions, based on taxonomic genus.	165
Figure 2.S4 Shoot dry biomass for <i>Medicago truncatula</i>	166
Figure 2.S5 Total mass of seeds for <i>Medicago truncatula</i>	167
Figure 2.S6 Germination rate of seeds for <i>Medicago truncatula</i> and <i>Brachypodium distachyon</i>	168
Figure 2.3 Bilan schématique des conséquences d’une dilution de diversité de la communauté microbienne sur la croissance et la fitness de trois espèces végétales.	170
Figure 3.1 Représentation schématique du principe de l’analyse ADN SIP, réalisée dans cette étude.	181
Figure 3.2 Exemple d’un gradient de centrifugation.	187
Figure 3.3 Quantité moyenne de ^{13}C (%).	191
Figure 3.4 Analyse en composantes principales de la structure génétique bactérienne et fongique pour les deux génotypes de <i>Medicago truncatula</i>	193
Figure 3.5 Analyse en composantes principales de la structure génétique bactérienne et fongique pour les compartiments racine et sol rhizosphérique.	195
Figure 3.S1 Analyse en composantes principales de la structure génétique bactérienne et fongique de la part active de la communauté microbienne rhizosphérique	209
Figure 3.6 Bilan de l’analyse ADN SIP	211
Figure 4.1 Bilan schématique des expérimentations conduites dans les chapitres I, II et III.	219

RESUME

La compréhension des interactions qui associent les plantes et les microorganismes du sol est une étape incontournable pour une gestion durable de nos écosystèmes notamment en agriculture. Parmi les services écosystémiques résultant de leurs interactions, on peut citer la productivité végétale répondant, en partie, aux besoins alimentaires de la population mondiale et la régulation des cycles biogéochimiques. Les services écosystémiques, qui émergent de telles interactions, reposent sur des liens trophiques pouvant être représentés par un compromis entre coûts et bénéfices pour les différents partenaires de l'interaction. Les plantes, organismes autotrophes ou producteurs primaires, sont des organismes clefs qui font entrer le carbone dans l'écosystème, via la photosynthèse. Une partie de ce carbone est libérée sous forme de molécules plus ou moins complexes, au niveau de leurs racines, par le processus de rhizodéposition. Ces composés servent de molécules signal et de nutriments pour les microorganismes du sol, essentiellement hétérotrophes, c'est l'effet rhizosphère. Ce processus est donc coûteux pour la plante mais bénéfique aux microorganismes. Les microorganismes contribuent, en retour, à la nutrition et la santé des plantes ce qui est coûteux mais leur assure une source bénéfique de nutriments. Ces échanges trophiques reposent néanmoins sur un équilibre dépendant des conditions biotiques et abiotiques qui affectent chaque partenaire. La biodiversité microbienne, de par la multitude d'interactions au sein des communautés microbiennes, est un facteur biotique important. Parmi les facteurs abiotiques, le contexte environnemental actuel, soumis aux changements globaux, est propice à une déstabilisation de ces interactions.

L'objectif de ce travail est donc de comprendre comment vont varier les coûts et bénéfices, pour chaque partenaire, suite à des modifications de l'environnement affectant l'un ou l'autre. L'intérêt étant de savoir si les bénéfices pour les plantes et les microorganismes, qui permettent les services écosystémiques, seront affectés.

Pour répondre à cet objectif, un cadre d'interaction plantes-microbes simplifié a été choisi et une déstabilisation, au niveau de la plante, a été effectuée au moyen d'une augmentation en CO₂ atmosphérique. L'interaction entre *Medicago truncatula* et *Pseudomonas fluorescens* a ainsi été étudiée. Les interactions ont ensuite été complexifiées en utilisant une communauté microbienne dans son ensemble et, cette fois, la modification a été appliquée au compartiment microbien soumis à une dilution de sa diversité. L'effet du gradient de diversité microbienne obtenu a été mesuré sur la croissance et la reproduction de trois espèces végétales modèles (*Medicago truncatula*, *Brachypodium distachyon* et *Arabidopsis thaliana*). Enfin, l'analyse s'est focalisée sur la communauté microbienne en identifiant la part active, c'est-à-dire les microorganismes qui utilisent les composés libérés par la plante. Ces microorganismes, qui interagissent réellement avec la plante, ont été détectés grâce à une analyse ADN SIP utilisant l'isotope ¹³C.

Les principaux résultats observés, que la modification affecte l'un ou l'autre des partenaires, sont une déstabilisation des coûts et bénéfices. La première étude montre une variation temporaire des interactions en faveur de la plante en condition de CO₂ augmenté. Dans le cas d'une dilution de la diversité microbienne, les coûts pour la plante sont conditionnés par la dépendance naturelle des plantes vis-à-vis des microorganismes symbiotiques qui interagissent avec le reste de la communauté. Cela est confirmé par la dernière expérimentation qui met en évidence les interactions microbes-microbes qui conditionnent la structure de la communauté microbienne interagissant avec la plante.

Ce travail a permis de clarifier le fonctionnement des relations plantes-microorganismes du sol et les facteurs qui contribuent à leur maintien essentiel au fonctionnement des écosystèmes. Ces études apportent aussi des pistes en vue de pouvoir prédire les impacts des changements globaux sur nos écosystèmes. Conserver ou restaurer les services écosystémiques est indispensable pour le bien-être humain.

Mots clés : *Medicago truncatula*, interactions plantes-microbes, rhizosphère, relations coûts-bénéfices, symbiotes, changement global, biodiversité, ADN SIP